

Perfis imunofenotípicos caraterísticos das doenças linfoproliferativas de células B

Joana Maria da Gama e Melo Martins Sereno

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Análises Clínicas

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Doutora Alice Santos Silva e da
Professora Doutora Margarida Lima

Julho, 2014

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Este trabalho com vista à obtenção do Grau de Mestre em Análises Clínicas foi realizado sob a orientação da Prof. Doutora Alice Santos Silva (Faculdade de Farmácia de Universidade do Porto) e da Prof. Doutora Margarida Lima (Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto e Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto).

Foi desenvolvido no âmbito de um estágio feito no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto, sob a orientação da Dra. Marta Gonçalves e com a coorientação da Dra. Maria Luís Queirós, técnicas superiores de Saúde deste laboratório.

AGRADECIMENTOS

No âmbito desta dissertação, quero agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a sua realização:

À Professora Doutora Alice Santos Silva, pela sua importante colaboração e sugestão de realização do estágio.

À Professora Doutora Margarida Lima, diretora do Departamento de Patologia e médica responsável pelo Laboratório de Citometria, pelo seu contributo fundamental, preciosos conselhos e pelo interesse e apoio incessantemente manifestados, assim como todo o tempo disponibilizado na transmissão de conhecimentos e esclarecimento de dúvidas.

À Dra. Marta Gonçalves e Dra. Maria Luís Queirós, técnicas superiores de saúde do Laboratório de Citometria, por me terem orientado durante o estágio, e também por partilharem comigo a sua experiência e conhecimento.

À Dra. Inês Freitas, diretora do Serviço de Hematologia Laboratorial, pela disponibilidade e ajuda na seleção de imagens para documentação das características morfológicas e obtenção das fotografias.

Quero também agradecer a todos os professores, sem exceção, que lecionaram no Mestrado em Análises Clínicas ao longo destes últimos dois anos e cujos conhecimentos transmitidos se revelaram extremamente úteis.

Por fim, quero agradecer à minha família, namorado e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram ao longo do meu percurso académico.

A todos, os meus sinceros e eternos agradecimentos.

RESUMO

As doenças linfoproliferativas de células B (DLP-B) incluem várias entidades distintas do ponto de vista biológico e clínico, desde neoplasias indolentes a outras com curso clínico agressivo. Por isso, é necessário proceder à sua rápida classificação de modo a proporcionar ao doente o tratamento correto. A citometria de fluxo (CF) é uma técnica rápida, sensível e reprodutível essencial para identificação e classificação de várias doenças hematológicas, incluindo as DLP-B, sendo também útil para prever prognóstico e resposta a certos tratamentos. No entanto, a classificação definitiva destas doenças depende da conjugação de vários dados laboratoriais e da sua integração no contexto clínico.

O objetivo deste estudo foi contribuir para a construção de um Atlas destas neoplasias, que possa ajudar na sua identificação e classificação, e ser usado como material de apoio para estudantes e profissionais das áreas das ciências da saúde.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar do Porto onde procedi ao acompanhamento dos casos estudados no laboratório, selecionando alguns casos representativos das DLP-B mais frequentes e caracterizando os seus aspetos clínicos, morfológicos e imunofenotípicos.

O trabalho aqui apresentado está dividido em três partes em que se apresenta sucessivamente: uma breve descrição do laboratório de citometria, as principais características das DLP-B e os casos clínicos selecionados para o futuro Atlas (Casos Clínicos).

Palavras-chave: doenças linfoproliferativas de células B, citometria de fluxo, imunofenotipagem, morfologia, citogenética, genética molecular.

ABSTRACT

B-cell lymphoproliferative disorders (B-LPD) include several entities distinct both biologically and clinically, from indolent tumors to others with aggressive clinical course. Therefore, it is necessary to proceed to its rapid classification to provide the right treatment to the patient. Flow cytometry (FC) is a rapid, sensitive and reproducible technique essential for identification and classification of various hematological diseases, including B-LPD, being also useful for predicting prognosis and response to certain treatments. However, the definitive classification of these diseases depends on the combination of several laboratory data and its integration into clinical context.

The goal of this study was to contribute to the construction of an Atlas of these neoplasms that can help in their identification and classification, and use as support material for students and professionals in areas of Health Sciences.

This study was conducted at the Laboratory of Cytometry Department of Clinical Hematology of the Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto, where I followed the cases studied in the laboratory, selecting some cases of the most frequent B-LPD and characterizing their clinical, morphological and immunophenotypic aspects.

The work presented here is divided into three parts, which present successively: a brief description of the Laboratory of Cytometry, the main features of B-LPD and the cases selected for the future atlas (Clinical Cases).

Keywords: B cell lymphoproliferative disorders, flow cytometry, immunophenotyping, morphology, cytogenetics, molecular genetics.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 BREVE DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO DE CITOMETRIA	2
1.1.1 Estrutura e organização do laboratório	2
1.1.2 Etapas do estudo das amostras	2
1.1.2.1 Receção de amostras	2
1.1.2.2 Processamento de amostras	3
1.1.2.3 Leitura das amostras	3
1.1.2.4 Análise e interpretação dos dados	4
1.1.2.5 Elaboração do relatório final de estudo	4
1.2 NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	5
1.3 DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS DE CÉLULAS B	11
1.3.1 Leucemia Linfocítica Crónica B / Linfoma Linfocítico	11
1.3.2 Linfoma Esplénico de Células B de Zona Marginal	13
1.3.3 Leucemia de Células Cabeludas / Leucemia de “Hairy Cells”	14
1.3.4 Linfoma Linfoplasmacítico	16
1.3.5 Linfoma Folicular	17
1.3.6 Linfoma do Manto	18
1.3.7 Linfocitose Persistente Policlonal de Linfócitos B Binucleados	20
1.3.8 Linfoma de Burkitt	21
1.3.9 Linfoma Difuso de Células B Grandes	22
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS	29
3.1.1 Execução de esfregaços	29
3.1.2 Coloração de esfregaços	29
3.1.3 Imunofenotipagem de linfócitos	30
3.1.3.1 Imunofenotipagem de antígenos expressos nas membranas das células	30
3.1.3.2 Imunofenotipagem de antígenos expressos no citoplasma das células	30
3.1.4 Procedimentos complementares	31

3.1.4.1 Separação de células mononucleadas em gradiente de densidade	31
4. RESULTADOS/DISCUSSÃO	34
4.1 CASOS CLÍNICOS SELECIONADOS.....	35
4.1.1 LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA B	35
4.1.1.1 Enquadramento teórico.....	35
4.1.1.2 CASO 1. LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA B, típica.....	36
4.1.1.3 CASO 2. LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA B, atípica.....	39
4.1.2 LINFOMA ESPLÉNICO DE CÉLULAS B DE ZONA MARGINAL.....	42
4.1.2.1 Enquadramento teórico.....	42
4.1.2.2 CASO 3. LINFOMA ESPLÉNICO DE CÉLULAS B DE ZONA MARGINAL.....	43
4.1.3 LEUCEMIA DE CÉLULAS CABELUDAS / LEUCEMIA DE “HAIRY CELLS” ...	46
4.1.3.1 Enquadramento teórico.....	46
4.1.3.2 CASO 4. LEUCEMIA DE CÉLULAS CABELUDAS	47
4.1.3.3 CASO 5. LEUCEMIA DE CÉLULAS CABELUDAS	50
4.1.4 LINFOMA LINFOPLASMÁCÍTICO.....	53
4.1.4.1 Enquadramento teórico.....	53
4.1.4.2 CASO 6. LINFOMA LINFOPLASMÁCÍTICO	54
4.1.4.3 CASO 7. LINFOMA LINFOPLASMÁCÍTICO	57
4.1.5 LINFOMA FOLICULAR	60
4.1.5.1 Enquadramento teórico.....	60
4.1.5.2 CASO 8. LINFOMA FOLICULAR	61
4.1.5.3 CASO 9. LINFOMA FOLICULAR	64
4.1.6 LINFOMA DO MANTO	67
4.1.6.1 Enquadramento teórico.....	67
4.1.6.2 CASO 10. LINFOMA DO MANTO	68
4.1.6.3 CASO 11. LINFOMA DO MANTO.....	71
4.1.7 LINFOCITOSE PERSISTENTE POLICLONAL DE LINFÓCITOS B BINUCLEADOS	74
4.1.7.1 Enquadramento teórico.....	74
4.1.7.2 CASO 12. LINFOCITOSE PERSISTENTE POLICLONAL DE LINFÓCITOS B BINUCLEADOS.....	75
4.1.7.3 CASO 13. LINFOCITOSE PERSISTENTE POLICLONAL DE LINFÓCITOS B BINUCLEADOS.....	78
4.1.8 LINFOMA DE BURKITT	81
4.1.8.1 Enquadramento teórico.....	81
4.1.8.2 CASO 14. LINFOMA DE BURKITT	82
4.1.8.3 CASO 15. LINFOMA DE BURKITT	85
4.1.9 LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES	88

4.1.9.1 Enquadramento teórico.....	88
4.1.9.2 CASO 16. LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES.....	89
5 CONCLUSÃO	92
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dot plots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com leucemia linfocítica crónica B típica (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	37
Figura 2 Esfregaço de sangue periférico de um doente com leucemia linfocítica crónica B típica (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)	38
Figura 3 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com leucemia linfocítica crónica B atípica (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	40
Figura 4 Esfregaço de sangue periférico de um doente com leucemia linfocítica crónica B atípica (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)	41
Figura 5 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com linfoma esplénico de células B da zona marginal (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	44
Figura 6 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfoma esplénico de células B da zona marginal (coloração de Leishman; painel A, 100x; painel B, 100x)	45
Figura 7 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células da medula óssea de um doente com tricoleucemia (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	48
Figura 8 Esfregaço de medula óssea de um doente com tricoleucemia (coloração de Leishman; 100x)	49
Figura 9 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com tricoleucemia (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	51
Figura 10 Esfregaço de sangue periférico de um doente com tricoleucemia (coloração de Leishman; 100x)	52
Figura 11 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de medula óssea de um doente com LPL (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	55
Figura 12 Esfregaço de medula óssea de um doente com linfoma linfoplasmacítico (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)	56
Figura 13 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com LPL (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	58
Figura 14 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfoma linfoplasmacítico (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)	59
Figura 15 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com linfoma folicular (■ linfócitos B neoplásicos; ■ linfócitos B normais; ■ restantes leucócitos)	62
Figura 16 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfoma folicular (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)	63
Figura 17 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com linfoma folicular (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	65
Figura 18 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfoma folicular (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)	66
Figura 19 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de medula óssea de um doente com linfoma do manto (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	69
Figura 20 Esfregaço de medula óssea de um doente com linfoma do manto (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)	70
Figura 21 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com linfoma do manto (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	72
Figura 22 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfoma do manto (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)	73

Figura 23 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de medula óssea de um doente com linfocitose persistente policlonal de linfócitos B binucleados (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	76
Figura 24 Esfregaço de medula óssea de um doente com linfocitose persistente policlonal de linfócitos B binucleados (coloração de Leishman; 100x)	77
Figura 25 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com linfocitose persistente policlonal de linfócitos B binucleados (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	79
Figura 26 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfocitose persistente policlonal de linfócitos B binucleados (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)	80
Figura 27 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de medula óssea de um doente com linfoma de Burkitt (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	83
Figura 28 Esfregaço de medula óssea de um doente com linfoma de Burkitt (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)	84
Figura 29 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de medula óssea de um doente com linfoma de Burkitt (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	86
Figura 30 Esfregaço de medula óssea de um doente com linfoma de Burkitt (coloração de Leishman; painel A, 100x; painel B, 100x)	87
Figura 31 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de um gânglio de um doente com linfoma difuso de células B grandes (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Classificação de neoplasias hematológicas da OMS de 2008(3).....	6
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABC: *Activated B cell*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANXA1: Anexina A1

B-CLL: *B-cell chronic lymphocytic leukemia*/Leucemia linfocítica crónica B

bFGF: *Basic fibroblast growth factor*

BL: *Burkitt lymphoma*/Linfoma de Burkitt

B-PLL: *B-cell prolymphocytic leukemia*/ Leucemia prólinfocítica B

CD: *Cluster of differentiation*

CF: Citometria de fluxo

DLBCL: *Diffuse large B-cell lymphoma*/Linfoma difuso de células B grandes

DLP-B: Doenças linfoproliferativas de células B

EBV: *Epstein-Barr virus*/Vírus Epstein-Barr

FISH: *Fluorescence in situ hybridization*

FL: *Follicular lymphoma*/Linfoma Folicular

GCB: *Germinal center B-cell like*

Hb: Hemoglobina

HCL: *Hairy cell leukemia*/Leucemia de células cabeludas

HPN: Hemoglobinúria paroxística noturna

IFN- γ : *Interferon gamma*

LC: Laboratório de Citometria

LPL: *Lymphoplasmacytic lymphoma*/Linfoma linfoplasmacítico

MALT lymphoma: *Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*/Linfoma extraganglionar de células B da zona marginal do tecido linfoide associado às mucosas

MBL: *Monoclonal B lymphocytosis*/ Linfocitose B monoclonal

MCL: *Mantle cell lymphoma*/Linfoma do Manto

MO: Medula óssea

MZL: *Marginal zone lymphoma*/Linfoma da zona marginal

NHL: *Non-Hodgkin lymphoma*/Linfoma não-Hodgkin

NK: *Natural killer*

NMZL: *Nodal marginal zone lymphoma*/Linfoma ganglionar da zona marginal

OMS: Organização Mundial de Saúde

PPBL: *Persistent polyclonal B lymphocytosis with binucleated lymphocytes*/ Linfocitose policlonal de linfócitos binucleados

SLVL: *Splenic B cell lymphoma with villous lymphocytes*/ linfoma esplénico de células B de zona marginal com linfócitos vilosos circulantes

SMZL: *Splenic marginal zone lymphoma*/Linfoma esplénico de células B da zona marginal

SNC: Sistema nervoso central

SP: Sangue periférico

TdT: *Terminal deoxynucleotidyl transferase*

TGF- β 1: *Transforming growth factor beta-1*

TGI: Trato gastrointestinal

TRAP: *Tartrate resistant acid phosphatase*/fosfatase ácida resistente ao tartarato

VIH: Vírus imunodeficiência humana

1 INTRODUÇÃO

1.1 BREVE DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO DE CITOMETRIA

1.1.1 Estrutura e organização do laboratório

O Laboratório de Citometria (LC) do Serviço de Hematologia Clínica é um laboratório diferenciado no estudo das doenças hematológicas. Recebe anualmente cerca de 3.500 amostras, do Centro Hospitalar do Porto e de outros hospitais, maioritariamente da região Norte do País. Cerca de 65% das amostras são provenientes do exterior. As amostras são de diversos tipos: sangue periférico, aspirado medular, biopsias e produtos de punção aspirativa de gânglios linfáticos e dos mais diversos órgãos e tecidos, líquidos biológicos (ex. líquido cefalo-raquidiano) e produtos de derrame (ex. líquido pleural, pericárdico, ascítico, etc.). Entre as patologias estudadas salientam-se as doenças linfoproliferativas, as leucemias agudas, os síndromas mielodisplásicos, o mieloma múltiplo, as gamopatias monoclonais de significado indeterminado e outras doenças do plasmócito. Para além dos estudos leucocitários, são também efetuados estudos dos eritrócitos e plaquetas.

O Laboratório tem 3 médicas, 2 técnicas superiores de saúde e 4 técnicas de diagnóstico e terapêutica, com reconhecida experiência na área.

No equipamento disponível há a referir em especial 4 citómetros – 2 citómetros modelo FACScanto II (Becton Dickinson) e dois citómetros NAVIOS (Beckman Coulter) e um contador hematológico modelo LH780 (Beckman Coulter)

Em termos funcionais, o LC encontra-se dividido em quatro setores, onde ocorre a receção das amostras, o processamento das mesmas, a análise/interpretação dos resultados, e a elaboração dos relatórios.

Durante este estudo tive a oportunidade de participar em todas as fases deste processo.

1.1.2 Etapas do estudo das amostras

1.1.2.1 Receção de amostras

Após a chegada da amostra, é conferida a identificação do doente e, após verificação dos dados constantes da requisição clínica, a amostra é registada no sistema informático, sendo-lhe atribuído um número de identificação. Os dados registados incluem, entre outros, a identificação do doente e do médico que solicita o estudo, o tipo de amostra, a sua proveniência, a data e hora de receção, o nome do técnico responsável pela sua receção e a informação clínica que consta na requisição. No mesmo sistema informático são inseridos, mais tarde, todos os restantes dados incluindo as análises realizadas, os respetivos resultados e o relatório final.

1.1.2.2 Processamento de amostras

O processamento das amostras começa com a contagem de células em contador hematológico automático e com a preparação e coloração de esfregaços, sempre que aplicável (amostras de sangue periférico e de medula óssea). Os esfregaços são corados com coloração de Leishman, e posteriormente observados no microscópio ótico, para caracterização da morfologia das células.

Para o processamento das amostras, a informação clínica assim como o hemograma ajudam na decisão do protocolo a seguir.

O LC concebeu protocolos de imunomarcagem para o estudo de diversas doenças hemato-oncológicas. Porém, este trabalho descreve apenas o protocolo referente às patologias por mim estudadas, nomeadamente, as doenças linfoproliferativas de células B (DLP-B).

Sempre que se suspeita de uma doença linfoproliferativa é executado, inicialmente, o protocolo de rastreio que inclui anticorpos específicos para antígenos expressos pelos linfócitos T, pelos linfócitos B e pelas células *natural killer* (NK): CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD20, CD56, cadeias leves *kappa* e *lambda*. O estudo é continuado, ou não, de acordo com os resultados obtidos, com a quantidade de amostra disponível e com a informação clínica. Na eventualidade do protocolo de rastreio confirmar a existência de uma DLP-B, é feito um estudo imunofenotípico complementar dos linfócitos B, usando um protocolo que permite avaliar outros antígenos como o CD10, CD11c, CD22, CD23, CD25, CD38, CD79b, FMC7, bcl2, cadeias pesadas das imunoglobulinas, entre outros. A maioria destas moléculas é expressa na membrana das células, mas algumas estão presentes apenas no interior das mesmas, nomeadamente no citoplasma, no núcleo ou nas membranas dos organelos intracelulares (ex. bcl2).

Na maioria dos casos de DLP-B são usadas combinações quadruplas de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos distintos, combinados de acordo com os protocolos internos do laboratório.

Os procedimentos técnicos usados para a coloração dos esfregaços e para a imunofenotipagem das amostras são descritos mais à frente.

1.1.2.3 Leitura das amostras

Os citómetros existentes no laboratório permitem uma análise multiparamétrica das células que inclui, para além das características de dispersão da luz – FSC, *forward scatter*, e SSC, *side scatter* –, que dão informação quanto ao tamanho e

complexidade das células, o estudo simultâneo, na mesma célula, de até 8 fluorescências distintas.

A leitura das amostras nos citómetros de fluxo é, sempre que possível, feita de imediato. Em caso de impossibilidade, as amostras são conservadas no frigorífico e a leitura é feita nas vinte e quatro horas seguintes. Em cada tubo são, de uma forma geral, lidas cerca de 200.000 células. A informação é armazenada em ficheiros de tipo FCS, que posteriormente são analisados.

1.1.2.4 Análise e interpretação dos dados

A análise dos dados é feita no programa INFINICYT (Cytognos). A análise é feita criteriosamente de modo a obter a identificação, caracterização e classificação correta das populações estudadas. Na interpretação dos resultados são tidos em consideração vários fatores, nomeadamente o tipo de amostra e os dados clínicos.

1.1.2.5 Elaboração do relatório final de estudo

O relatório final é um relatório de carácter descritivo e interpretativo onde, para além dos resultados obtidos, é, sempre que possível, proposto o diagnóstico mais provável e indicados os eventuais diagnósticos diferenciais. Sempre que necessário, é também sugerida a realização de outros estudos importantes para estabelecer um diagnóstico definitivo, nomeadamente estudos citogenéticos ou moleculares.

1.2 NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

A definição mais simples de neoplasia hematológica é a de que se origina a partir de uma única célula, e que expande de uma forma clonal e se torna neoplásica. Quando isto acontece, a célula divide-se dando origem a células idênticas (expansão clonal) e adquire as vantagens de sobrevivência e/ou proliferação em relação às outras células adquirindo autonomia (neoplasia), e, por vezes, características que a tornam maligna (invasão de órgãos e tecidos com destruição das estruturas adjacentes, metastização à distância, etc.) (1). As neoplasias linfóides podem ter origem em células linfóides presentes nos órgãos hematopoiéticos e linfopoiéticos (como a medula óssea e o timo), nos órgãos linfóides secundários (como os gânglios linfáticos), que circulam no sangue ou que estão presentes no tecido linfóide dos diversos órgãos ou tecidos (como o tecido linfóide associado à pele e as mucosas) (1).

As leucemias e linfomas são as neoplasias hematológicas mais comuns. Em anos recentes tornou-se claro que representam vários grupos de patologias que incluem um largo número de entidades distintas do ponto de vista biológico (2). Assim, foi necessário estabelecer uma classificação que permitisse distingui-las de acordo com as suas características. A classificação atualmente aceita é a da Organização Mundial de Saúde (OMS), atualizada pela última vez em 2008 (3) (Tabela 1).

Tabela 1 Classificação de neoplasias hematológicas da OMS de 2008(3)

WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues	
MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS	
Chronic myelogenous leukaemia, <i>BCR-ABL1</i> positive	9875/3
Chronic neutrophilic leukaemia	9963/3
Polycythaemia vera	9950/3
Primary myelofibrosis	9961/3
Essential thrombocythaemia	9962/3
Chronic eosinophilic leukaemia, NOS	9964/3
Mastocytosis	
Cutaneous mastocytosis	9740/1
Systemic mastocytosis	9741/3
Mast cell leukaemia	9742/3
Mast cell sarcoma	9740/3
Extracutaneous mastocytoma	9740/1
Myeloproliferative neoplasm, unclassifiable	9975/3
MYELOID AND LYMPHOID NEOPLASMS WITH EOSINOPHILIA AND ABNORMALITIES OF <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i> OR <i>FGFR1</i>	
Myeloid and lymphoid neoplasms with <i>PDGFRA</i> rearrangement	9965/3
Myeloid neoplasms with <i>PDGFRB</i> rearrangement	9966/3
Myeloid and lymphoid neoplasms with <i>FGFR1</i> abnormalities	9967/3
MYELODYSPLASTIC/MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS	
Chronic myelomonocytic leukaemia	9945/3
Atypical chronic myeloid leukaemia, <i>BCR-ABL1</i> negative	9876/3
Juvenile myelomonocytic leukaemia	9946/3
Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable	9975/3
Refractory anaemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis	9982/3
MYELODYSPLASTIC SYNDROMES	
Refractory cytopenia with unilineage dysplasia	
Refractory anaemia	9980/3
Refractory neutropenia	9991/3
Refractory thrombocytopenia	9992/3
Refractory anaemia with ring sideroblasts	9982/3
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia	9985/3
Refractory anaemia with excess blasts	9983/3
Myelodysplastic syndrome associated with isolated del(5q)	9986/3
Myelodysplastic syndrome, unclassifiable	9989/3
Childhood myelodysplastic syndrome	
Refractory cytopenia of childhood	9985/3
ACUTE MYELOID LEUKAEMIA (AML) AND RELATED PRECURSOR NEOPLASMS	
AML with recurrent genetic abnormalities	
AML with t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	9896/3
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	9871/3
Acute promyelocytic leukaemia with t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>	9866/3
AML with t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>	9897/3
AML with t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>	9865/3
AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>	9869/3
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>	9911/3
AML with mutated <i>NPM1</i>	9861/3
AML with mutated <i>CEBPA</i>	9861/3
AML with myelodysplasia-related changes	9895/3
Therapy-related myeloid neoplasms	9920/3

Acute myeloid leukaemia, NOS	9861/3	B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities	
AML with minimal differentiation	9872/3	B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>	9812/3
AML without maturation	9873/3	B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranged	9813/3
AML with maturation	9874/3	B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(12;21)(p13;q22); <i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i>	9814/3
Acute myelomonocytic leukaemia	9867/3	B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with hyperdiploidy	9815/3
Acute monoblastic and monocytic leukaemia	9891/3	B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with hypodiploidy (hypodiploid ALL)	9816/3
Acute erythroid leukaemia	9840/3	B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(5;14)(q31;q32); <i>IL3-IGH</i>	9817/3
Acute megakaryoblastic leukaemia	9910/3	B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); <i>E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)</i>	9818/3
Acute basophilic leukaemia	9870/3	T lymphoblastic leukaemia/lymphoma	9837/3
Acute panmyelosis with myelofibrosis	9931/3		
Myeloid sarcoma	9930/3		
Myeloid proliferations related to Down syndrome			
Transient abnormal myelopoiesis	9898/1		
Myeloid leukaemia associated with Down syndrome	9898/3		
Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm	9727/3		
ACUTE LEUKAEMIAS OF AMBIGUOUS LINEAGE		MATURE B-CELL NEOPLASMS	
Acute undifferentiated leukaemia	9801/3	Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma	9823/3
Mixed phenotype acute leukaemia with t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>	9806/3	B-cell prolymphocytic leukaemia	9833/3
Mixed phenotype acute leukaemia with t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranged	9807/3	Splenic B-cell marginal zone lymphoma	9689/3
Mixed phenotype acute leukaemia, B/myeloid, NOS	9808/3	Hairy cell leukaemia	9940/3
Mixed phenotype acute leukaemia, T/myeloid, NOS	9809/3	<i>Splenic B-cell lymphoma/leukaemia, unclassifiable</i>	9591/3
<i>Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma</i>		<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>	9591/3
		<i>Hairy cell leukaemia-variant</i>	9591/3
		Lymphoplasmacytic lymphoma	9671/3
		Waldenström macroglobulinemia	9761/3
		Heavy chain diseases	9762/3
		Alpha heavy chain disease	9762/3
		Gamma heavy chain disease	9762/3
		Mu heavy chain disease	9762/3
PRECURSOR LYMPHOID NEOPLASMS		Plasma cell myeloma	9732/3
B lymphoblastic leukaemia/lymphoma		Solitary plasmacytoma of bone	9731/3
B lymphoblastic leukaemia/lymphoma, NOS	9811/3	Extraosseous plasmacytoma	9734/3

Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	9699/3	Systemic EBV positive T-cell lymphoproliferative disease of childhood	9724/3
Nodal marginal zone lymphoma	9699/3	Hydroa vacciniforme-like lymphoma	9725/3
<i>Paediatric nodal marginal zone lymphoma</i>	9699/3	Adult T-cell leukaemia/lymphoma	9827/3
Follicular lymphoma	9690/3	Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type	9719/3
<i>Paediatric follicular lymphoma</i>	9690/3	Enteropathy-associated T-cell lymphoma	9717/3
Primary cutaneous follicle centre lymphoma	9597/3	Hepatosplenic T-cell lymphoma	9716/3
Mantle cell lymphoma	9673/3	Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma	9708/3
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS	9680/3	Mycosis fungoides	9700/3
T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma	9688/3	Sézary syndrome	9701/3
Primary DLBCL of the CNS	9680/3	Primary cutaneous CD30 positive T-cell lymphoproliferative disorders	
Primary cutaneous DLBCL, leg type	9680/3	Lymphomatoid papulosis	9718/1
<i>EBV positive DLBCL of the elderly</i>	9680/3	Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma	9718/3
DLBCL associated with chronic inflammation	9680/3	Primary cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma	9726/3
Lymphomatoid granulomatosis	9766/1	<i>Primary cutaneous CD8 positive aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma</i>	9709/3
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma	9679/3	<i>Primary cutaneous CD4 positive small/medium T-cell lymphoma</i>	9709/3
Intravascular large B-cell lymphoma	9712/3	Peripheral T-cell lymphoma, NOS	9702/3
ALK positive large B-cell lymphoma	9737/3	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma	9705/3
Plasmablastic lymphoma	9735/3	Anaplastic large cell lymphoma, <i>ALK</i> positive	9714/3
Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease	9738/3	<i>Anaplastic large cell lymphoma, ALK negative</i>	9702/3
Primary effusion lymphoma	9678/3		
Burkitt lymphoma	9687/3		
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma	9680/3		
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma	9596/3		
MATURE T-CELL AND NK-CELL NEOPLASMS			
T-cell prolymphocytic leukaemia	9834/3	HODGKIN LYMPHOMA	
T-cell large granular lymphocytic leukaemia	9831/3	Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma	9659/3
<i>Chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells</i>	9831/3	Classical Hodgkin lymphoma	9650/3
Aggressive NK cell leukaemia	9948/3	Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma	9663/3
		Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma	9651/3
		Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma	9652/3
		Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma	9653/3

HISTIOCYTIC AND DENDRITIC CELL NEOPLASMS	
Histiocytic sarcoma	9755/3
Langerhans cell histiocytosis	9751/3
Langerhans cell sarcoma	9756/3
Interdigitating dendritic cell sarcoma	9757/3
Follicular dendritic cell sarcoma	9758/3
Fibroblastic reticular cell tumour	9759/3
Indeterminate dendritic cell tumour	9757/3
Disseminated juvenile xanthogranuloma	
POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS (PTLD)	
Early lesions	
Plasmacytic hyperplasia	9971/1
Infectious mononucleosis-like PTLD	9971/1
Polymorphic PTLD	9971/3
Monomorphic PTLD (B- and T/NK-cell types)*	
Classical Hodgkin lymphoma type PTLD*	
NOS: not otherwise specified.	
The italicized numbers are provisional codes for the 4th edition of ICD-O. While they are expected to be incorporated in the next ICD-O edition, they currently remain subject to changes.	
The italicized histologic types are provisional entities, for which the WHO Working Group felt there was insufficient evidence to recognize as distinct diseases at this time.	
*These lesions are classified according to the leukaemia or lymphoma to which they correspond, and are assigned the respective ICD-O code.	

Uma classificação deve conter patologias que estão claramente definidas, clinicamente distintas, e, idealmente, deve incluir todas as entidades conhecidas. Para além disso, deve servir como base para futuras investigações, e deve permitir a incorporação de novas informações à medida que estas se tornam disponíveis. Não há um padrão de ouro pelo qual todas as patologias são definidas na classificação da OMS. A morfologia é muito importante e muitas entidades têm características morfológicas únicas ou distintas. No entanto, recentemente tanto as características imunofenotípicas como as genéticas são uma parte importante na diferenciação das neoplasias hematológicas. A classificação de OMS estratifica primariamente as neoplasias de acordo com a linhagem celular: mielóides, linfóides e histiocíticas / dendríticas (3).

As neoplasias de células B maduras compreendem cerca de 90% das neoplasias linfóides em todo o Mundo e representam aproximadamente 2.5% dos novos cânceros todos os anos. São mais comuns em países desenvolvidos, nomeadamente Estados Unidos da América, Austrália, Nova Zelândia e Europa Ocidental. No entanto, variam individualmente na sua frequência relativa em diferentes partes do Mundo (3,4).

A classificação das neoplasias hematológicas reúne toda a informação disponível para definir entidades. Em muitos casos a imunofenotipagem fornece indicações importantes para o diagnóstico, mas nenhum marcador é específico e a combinação de características morfológicas e um painel de marcadores são necessários para o diagnóstico correto (3).

Nos últimos anos imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) tornou-se indispensável para o diagnóstico de neoplasias de células B maduras através da identificação de células fenotipicamente anormais de linhagem B e do reconhecimento de características fenotípicas para separar entidades distintas. Adicionalmente, a CF também pode ser utilizada para avaliar infiltração de diferentes órgãos e tecidos pelas células neoplásicas, o que é necessário para o estadiamento, assim como para avaliar a resposta à terapêutica e monitorizar a doença; para além disso, algumas características fenotípicas podem ajudar a seleccionar o tratamento e a avaliar o prognóstico (5).

Mais recentemente, as características genéticas, cromossómicas e moleculares também começaram a ter um papel importante na classificação de neoplasias linfóides, sendo que algumas alterações foram recorrentemente associadas a certas patologias e/ou associadas a prognósticos distintos. Contudo, o papel da maior parte destas alterações adquiridas ainda não foi clarificado (6).

Apresentamos as principais características das doenças linfoproliferativas de células B (DLP-B) mais frequentes, dando ênfase aos aspetos clínicos e laboratoriais que fundamentam o diagnóstico.

1.3 DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS DE CÉLULAS B

1.3.1 Leucemia Linfocítica Crônica B / Linfoma Linfocítico

A leucemia linfocítica crônica B (B-CLL, *B-cell chronic lymphocytic leukemia*) é uma neoplasia crônica caracterizada pela acumulação de linfócitos B no sangue periférico (SP), na medula óssea (MO), gânglios linfáticos e no baço (7). É a leucemia mais comum no Mundo Ocidental e em adultos. Tem um curso clínico muito variável, uma vez que alguns doentes morrem após alguns meses do diagnóstico ao passo que outros vivem 20 ou mais anos (8,9).

A B-CLL é rara em pessoas novas e a incidência aumenta a partir da quarta década, sendo a idade média de diagnóstico de 69,9 anos. Mais de 80% dos doentes tem mais de 60 anos (2). A taxa de incidência é de cerca de 2-6 casos por 100 000 pessoas por ano, e os homens são mais afetados do que as mulheres numa razão de 2:1 (3).

A maioria dos doentes está assintomática na altura do diagnóstico, sendo a patologia descoberta em exames de rotina. O diagnóstico requer a presença de pelo menos 5×10^9 linfócitos B/L no sangue periférico. No entanto, na ausência de adenopatias, organomegalia ou citopenias, a presença desta linfocitose é definida como Linfocitose B Monoclonal (MBL, *monoclonal B lymphocytosis*) (10). Pensa-se que todos os casos de B-CLL são precedidos de MBL, sendo esta detetada em cerca de 5% da população idosa e tendo um risco de evolução para B-CLL de 1% por ano (11).

Apesar da maioria dos doentes estar assintomática na data do diagnóstico, cerca de 5 a 10% apresenta um ou mais sintomas, genericamente conhecidos como sintomas B como perda de peso, febre sem sinal de infeção, sudorese noturna, astenia e anorexia (10).

Quando há sinais, os mais comuns são as adenopatias que ocorrem em cerca de 50% dos casos e que podem ser generalizadas ou localizadas. A esplenomegalia é o segundo sinal mais frequente, enquanto hepatomegalia é rara (12).

Nas formas típicas de B-CLL, os linfócitos neoplásicos são células pequenas com núcleo redondo, cromatina condensada e citoplasma escasso. Para além disso, no esfregaço de sangue periférico observam-se frequentemente sombras de Gumprecht, que são células rompidas durante a preparação devido a fragilidade da sua membrana.

Nalguns casos podem ser observadas células linfóides com morfologia atípica, nomeadamente prolinfócitos. Quando estas células excedem 15% dos linfócitos circulantes a leucemia é designada “atípica”. Se a percentagem for superior a 55% designa-se por Leucemia Prolinfocítica B (B-PLL, *B-cell prolymphocytic leukemia*) (14,15,16).

Os linfócitos neoplásicos circulantes vão infiltrando progressivamente a medula óssea, estando definidos quatro padrões de infiltração medular: intersticial – em que há algum grau de substituição de tecido hematopoiético normal por linfócitos, mas com preservação de células adiposas; nodular, em que se visualizam nódulos de linfócitos neoplásicos, sem infiltração intersticial e com preservação das células adiposas; difuso, em que existe uma infiltração linfóide difusa com substituição do tecido hematopoiético normal assim como de células adiposas da medula óssea; misto, em que existem zonas com infiltração intersticial e outras com infiltração nodular. Os casos com infiltração difusa ou mista têm prognóstico mais desfavorável do que os casos com infiltração intersticial e nodular (17).

A análise imunofenotípica por CF é um componente chave para diagnóstico da B-CLL. Assim, as células neoplásicas expressam a maioria das moléculas habitualmente presentes nos linfócitos B maduros normais, embora com intensidade aberrante: CD19, CD20 (fraco), CD22 (fraco), CD79b (fraco ou ausente) e FMC7 (fraco ou ausente). Para além disso expressam caracteristicamente CD5 e CD23 e são negativos para CD10 (18). Relativamente às imunoglobulinas de membrana, as células neoplásicas tem expressão reduzida ou mesmo ausente de cadeias pesadas de IgM ou IgD e de leves, *kappa* ou *lambda* (19,20). O CD38 tem uma expressão variável sendo a maior parte das vezes negativo. No entanto, se a sua positividade se verificar em 30% das células neoplásicas o prognóstico é desfavorável, estando associado com estadio mais avançado, progressão da doença e sobrevida mais curta. O mesmo se aplica à proteína ZAP-70, se for positiva em mais de 20% das células neoplásicas (21,22,23).

Ultimamente demonstrou-se que a presença de determinadas alterações citogenéticas tem impacto na sobrevivência e pode ajudar a caracterizar B-CLL em subtipos com prognóstico distinto (24). No entanto, a deteção destas alterações por técnicas de citogenética convencionais (cariótipo) está muitas vezes limitada pela baixa taxa mitótica de células neoplásicas, sendo a técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) mais sensível (21).

A del13q é a anomalia mais comum e está associada a bom prognóstico, com progressão lenta da doença. (21). Seguidamente é a trissomia 21, associada com morfologia atípica, alta taxa de proliferativa e estadio clínico avançado. Associada a mau prognóstico está também a del11q identificada em pessoas mais novas e estadios clínicos avançados (25). Finalmente, temos a del17p, de prognóstico também desfavorável, associada com mutações do gene p53, supressor de tumores. A mutação deste gene pode facilitar a transmissão de ácido desoxirribonucleico (ADN) alterado e a emergência de clones neoplásicos com vantagem de sobrevivência. Assim, esta deleção

em doentes com B-CLL está fortemente associada com estadio clínico avançado, doença progressiva e má resposta ao tratamento (26). Mais raramente foram observadas del6q e del14q associadas com evolução para B-PLL e doença agressiva (21).

1.3.2 Linfoma Esplénico de Células B de Zona Marginal

O linfoma de zona marginal (MZL, *marginal zone lymphoma*) é uma neoplasia indolente de células B maduras reconhecida pela classificação da OMS como três entidades: linfoma ganglionar de células B da zona marginal (NMZL, *nodal marginal zone lymphoma*), linfoma esplénico de células B da zona marginal (SMZL, *splenic marginal zone lymphoma*) e linfoma extraganglionar de células B da zona marginal do tecido linfóide associado às mucosas (MALT lymphoma, *extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue*). Os subtipos partilham um imunofenótipo semelhante, mas diferem nas características clínicas e prognóstico (27). Neste estudo vamos dar relevância ao SMZL.

O SMZL é uma neoplasia rara representando 2% das neoplasias linfóides (3). Ocorre nas pessoas com mais de 50 anos, com idade média de 68 anos, afetando mais homens do que mulheres (28,29). Envolve o baço, a MO e o SP. Por sua vez, os gânglios linfáticos geralmente não estão envolvidos (30).

Pensa-se que o SMZL deriva de células B da zona marginal (parte exterior da zona dos mantos dos folículos linfóides) (7). Na data do diagnóstico os doentes podem encontrar-se assintomáticos. No entanto, é frequente que tenham esplenomegalia que se for acentuada pode causar desconforto abdominal. Também podem ter hepatomegalia, mas raramente têm adenomegalias. No hemograma é comum observar-se linfocitose, com anemia e/ou trombocitopenia em cerca de 50% dos casos (31,32).

As células neoplásicas encontradas no SP são linfócitos de tamanho médio com núcleo redondo, cromatina condensada e citoplasma basófilo, e podem ter projeções citoplasmáticas que podem estar distribuídas de forma homogénea na membrana da célula ou ter uma distribuição polar, pelo que são designados de “linfócitos vilosos”. A percentagem de linfócitos vilosos no sangue é muito variável e, quando estão presentes, a patologia é designada linfoma esplénico de células B de zona marginal com linfócitos vilosos circulantes (SLVL, *splenic B cell lymphoma with villous lymphocytes*) (33,34).

Na fase inicial da doença o envolvimento da MO pode ser subtil. O padrão de infiltração é tipicamente intrasinusoidal, e com a progressão da doença torna-se nodular. Em casos avançados, combinação de infiltração nodular e intrasinusoidal é característica, apesar de não específica. As células neoplásicas que infiltram a medula óssea têm tamanho

pequeno a médio, núcleo redondo ou oval com contornos regulares e uma pequena quantidade de citoplasma (33).

No baço, a polpa branca é invadida por células que infiltram e substituem os folículos linfóides e, na polpa vermelha, as células neoplásicas formam nódulos linfóides e infiltrados mais ou menos difusos, com invasão das sinusóides (3,35,36).

Quanto à análise imunofenotípica por CF, as células neoplásicas expressam os marcadores normais de células B, embora a sua intensidade seja frequentemente anormal, como CD19, CD20 (forte), CD22 (forte) e CD79b. O CD11c é expresso em alguns casos, mas ao contrário do que acontece na leucemia de células cabeludas (*hairy cells*) não expressam CD25 ou CD103. Relativamente às imunoglobulinas de membrana, as células neoplásicas expressam, geralmente IgM e apresentam restrição de cadeias leves (*kappa* ou *lambda*) (37). CD38 tem uma expressão variável e o CD10, o CD23 e a ciclina D1 são negativos. O CD5 é geralmente negativo, podendo em raros casos ser positivo (34,36,37).

Em cerca de 70 a 80% dos casos, existem alterações citogenéticas por análise FISH. A mais frequente é a del7q e o ganho 3q (38,39). Embora a doença tenha geralmente um curso indolente, sendo o tempo médio de sobrevida de 10 anos, em cerca de um terço dos casos o curso clínico é agressivo e a sobrevida curta, entre 1 e 2 anos (40,41). A del7q está associada com curso agressivo da doença e prognóstico desfavorável (42). Embora raramente, também pode ser encontradas mutações no gene P53, que também está relacionada com curso agressivo da doença e prognóstico desfavorável; no entanto, esta mutação não é recorrente nem específica de SMZL (43).

1.3.3 Leucemia de Células Cabeludas / Leucemia de “Hairy Cells”

A leucemia de células cabeludas (HCL, *Hairy Cell Leukemia*) é uma neoplasia de células B maduras que envolve a MO, o baço e o SP, e se associa a fibrose medular (3). É uma patologia rara constituindo apenas 2% das neoplasias linfóides (44). Os homens são mais afetados do que as mulheres numa razão de 4:1 e a idade média de incidência é de 58 anos (45,46).

A HCL é uma patologia indolente e cursa frequentemente com esplenomegalia, por vezes acentuada, que pode ser acompanhada por hepatomegalia. Os doentes também podem apresentar anemia e trombocitopenia, com fadiga e hemorragias, e caracteristicamente neutropenia e monocitopenia, com infeções recorrentes. Os gânglios linfáticos geralmente não se encontram envolvidos (47).

As células neoplásicas típicas são de tamanho médio a grande com citoplasma abundante de contorno irregular, com numerosas vilosidades citoplasmáticas, e que

ocasionalmente pode conter vacúolos ou inclusões. O núcleo é oval ou reniforme com cromatina homogênea e nucléolo por vezes visível (48,49,50).

Estudos histológicos demonstram que o baço tem infiltração difusa da polpa vermelha por células neoplásicas e atrofia da polpa branca (51). A fibrose da medula óssea é muito característica da HCL, o que torna muito difícil a sua aspiração. Pensa-se que a fibrose é constituída por redes de reticulina produzida pelas células neoplásicas e por fibroblastos através da produção de fatores de crescimento como o bFGF (*Basic fibroblast growth factor*) e o TGF- β 1 (*Transforming growth factor beta-1*) (52,53,54).

Do ponto de vista imunocitoquímico, é característico as células neoplásicas terem fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, *Tartrate-resistant acid phosphatase*) (55).

Quanto à análise imunofenotípica por CF, as células neoplásicas são positivas para marcadores de linfócitos B como CD19, CD20 (forte), CD22 (forte), CD79b e FMC7 e são monoclonais com restrição de cadeias leves (*kappa* ou *lambda*). Para além disso, expressam caracteristicamente CD11c, CD25, CD103 e CD123, e não expressam CD5 e CD10 (56,57).

Nos estudos imunohistoquímicos é típica a expressão de Anexina A1 (ANXA1), uma proteína que tem um papel na resposta inflamatória e que normalmente é expressa em células mielóides, macrófagos e em células T. É útil para o diagnóstico de HCL, uma vez que não se observa em mais nenhuma DLP-B (58,59). Nestes estudos também se observa positividade para T-bet, um fator de transcrição que controla a expressão de interferão gama (IFN- γ), DBA.44 (CD72) e ciclina D1 (expressão fraca) (3,48).

A HCL não tem nenhuma alteração genética recorrente associada, tendo sido apenas descritas algumas anomalias nos cromossomas 5 e 7 (3,45).

Em 1980 foi descrita uma variante da HCL. É uma patologia muito rara representando cerca de 10% das HCL totais e tem características distintas da HCL clássica como alta contagem de leucócitos sem neutropenia e monocitopenia; para além disso geralmente não existe fibrose medular. A morfologia das células neoplásicas é semelhante diferindo na presença de nucléolo proeminente. Ao contrário do que acontece na HCL clássica, a análise imunofenotípica revela que as células B neoplásicas da HCL variante não expressam CD25, sendo variável a expressão de CD103; por outro lado também não se observa expressão de TRAP e de ANXA1. Esta diferenciação entre as duas patologias é importante uma vez que a HCL variante é uma doença mais agressiva do que HCL clássica e não responde ao mesmo tipo de tratamento (60,61,62).

1.3.4 Linfoma Linfoplasmacítico

O linfoma linfoplasmacítico (LPL, *lymphoplasmacytic lymphoma*) é uma doença linfoproliferativa crónica caracterizada pela presença de linfócitos B pequenos, células linfoplasmocitárias e plasmócitos, que envolve a MO e por vezes gânglios linfáticos, baço e SP (63).

A classificação da OMS, de 2008, define a Macroglobulinemia de Waldenstrom como um subtipo de LPL com envolvimento de medula óssea que tem um nível elevado de IgM monoclonal no soro (63).

O LPL é uma neoplasia rara representando 1.5% dos linfomas. A idade média ao diagnóstico é de 60 anos, ligeiramente mais frequente nos homens relativamente às mulheres (64,65). A maioria dos doentes apresenta fraqueza e fadiga relacionada com anemia. Alguns casos podem apresentar adenomegalias e hepatomegalia (66). A IgM monoclonal presente no soro pode dar origem à síndrome de hiperviscosidade que cursa com o aparecimento de outros sintomas como hemorragias, distúrbios visuais e cefaleias. Outras manifestações neurológicas mais severas incluem confusão mental e défices neurológicos (67). As crioglobulinas são imunoglobulinas que precipitam a temperaturas inferiores a 37º, formando agregados moleculares complexos, constituídos por imunoglobulinas, fragmentos do complemento e fragmentos de ácidos nucleicos. A presença de níveis elevados de crioglobulinas no soro leva a manifestações clínicas, geralmente como resultado da deposição de complexos imunes nos vasos sanguíneos da pele, do sistema nervoso periférico e dos rins (68). Também podem ocorrer depósitos de IgM na pele ou trato gastrointestinal causando diarreias, e coagulopatia resultantes da ligação de IgM a fatores de coagulação (3).

Nos LPL também pode existir linfocitose e as células neoplásicas são pequenas com núcleo redondo, cromatina condensada e citoplasma escasso. Coexistem com um número variável de plasmócitos, que são células de maior tamanho, forma oval, núcleo grande excêntrico e citoplasma basófilo, e com um número variável de células linfoplasmocitárias com forma intermédia entre linfócito e plasmócito. Também se observa frequentemente a presença de corpos de Dutcher, ou seja, inclusões citoplasmáticas de imunoglobulinas (69,70).

A MO está quase sempre envolvida e estudos histológicos apresentam um infiltrado difuso de linfócitos pequenos, células linfoplasmocitárias e plasmócitos em proporções muito variáveis (71).

Relativamente à análise por CF, não existe um perfil fenotípico específico para esta patologia. As células neoplásicas expressam os marcadores normais de linfócitos B CD19, CD20, CD22, CD79a e imunoglobulinas de membrana, geralmente IgM, com

restrição de cadeias leves (*kappa* ou *lambda*), e são negativas para CD5, CD10, CD23 e CD103, excluindo o diagnóstico de B-CLL e HCL. A expressão de CD25 e CD38 é variável. Os plasmócitos expressam CD38 (forte), assim como CD138, e são negativos para CD20, expressando cadeias μ de imunoglobulinas no citoplasma (3,72). Os plasmócitos também expressam PAX5, um fator de transcrição específico de células B com múltiplas funções reguladoras. Como não é normalmente expresso em plasmócitos, este marcador pode ser muito útil para o diagnóstico de LPL (73).

No que respeita às alterações genéticas a análise por FISH permite detetar a del6q em 50% dos casos. No entanto, esta alteração não é específica para LPL.

A doença tem um curso indolente e a sobrevida média é de 5 a 10 anos. Existem alguns casos de doença agressiva que estão associados a alguns fatores como idade avançada, valores baixos de hemoglobina (Hb) e albumina e valores altos de β 2-microglobulina. A presença de del6q também foi associada a doença mais agressiva e prognóstico desfavorável (67,74).

1.3.5 Linfoma Folicular

O linfoma folicular (FL, *Follicular Lymphoma*) é uma neoplasia de células B com origem no centro germinativo dos folículos linfóides que atinge predominantemente gânglios linfáticos, podendo também envolver o baço, a MO e o SP (75). É uma patologia de curso indolente e sobrevida prolongada, representando 20% de todos os linfomas com grande incidência nos Estados Unidos da América e Europa Ocidental (76,77,78).

De acordo com a classificação da OMS de 2008, consideram-se 3 graus de acordo com o número de centroblastos observados por campo de microscópio: grau 1 – 0 a 5 centroblastos; grau 2 – 6 a 15 centroblastos; grau 3 – mais de 15 centroblastos. Por sua vez o grau 3 é subdividido em: 3A – pequenos centrócitos presentes apesar de a maioria ser centroblastos; 3B – centroblastos sólidos e centrócitos completamente ausentes (79).

A doença afeta tanto homens como mulheres e a idade média de diagnóstico é 60 anos (3). Os doentes apresentam geralmente adenopatias generalizadas e cerca de 10% dos doentes têm sudorese noturna, perda de peso e febre. A doença geralmente está disseminada na apresentação com envolvimento de gânglios, fígado e baço e a MO está envolvida em cerca de 40 a 70% dos casos na altura do diagnóstico (80).

Na maior parte dos casos, o estudo histológico mostra um padrão de crescimento folicular com folículos neoplásicos geralmente pouco definidos e sem zonas de manto (3,81,82).

Como já foi referido, as células neoplásicas típicas são de 2 tipos: centrócitos – pequenos linfócitos com cromatina densa, fenda nuclear e citoplasma escasso;

centroblastos – linfócitos grandes com núcleo redondo ou oval, cromatina vesicular, nucléolos periféricos e citoplasma basófilo. A percentagem destas células é extremamente variável (3).

A análise imunofenotípica por CF revela um painel característico em que as células neoplásicas expressam marcadores comuns aos linfócitos B normais – CD19 (fraco), CD20, CD22, FMC7 e imunoglobulinas de membrana, IgM ou IgG com restrição de cadeias leves (*kappa* ou *lambda*) (83). Caracteristicamente expressam CD10 e bcl-6, duas moléculas presentes nas células B do centro germinativo e, em resultado da alteração genética subjacente – t(14;18) –, apresentam um aumento da expressão de bcl-2, uma proteína com propriedades anti-apoptóticas, que normalmente não é expressa por células do centro germinativo. Para além disso, são negativas para CD5 e CD43 (82,84,85).

Relativamente à análise citogenética por FISH, existe uma alteração recorrente associada ao FL que é a t (14;18), presente em 90% dos casos (86). O resultado desta translocação é a justaposição do gene BCL-2, localizado no cromossoma 18, ao gene IGH, localizado no cromossoma 14, o que conduz ao aumento de expressão da proteína bcl-2. Esta translocação tem valor diagnóstico, mas não prognóstico (87).

Existem outras alterações genéticas, sendo que algumas acarretam prognóstico desfavorável como a del6q, a del17p, e a del1p, os ganhos 12,18p e Xp; e os casos raros com t (14;18) e t (8;14); assim como outras sem valor de prognóstico, como a del10q e os ganhos 1, 6p, 7, 8 e 18q (3,87).

Recentemente surgiu evidência de que os FL tipo 3B não apresentam a t (14;18) e perdem a expressão de CD10, com aumento de mutações no gene p53, do que resulta um curso mais agressivo de doença (88).

1.3.6 Linfoma do Manto

O linfoma do Manto (MCL, *Mantle Cell Lymphoma*) é uma neoplasia de células B com origem na zona do manto dos folículos linfóides e com envolvimento predominante de gânglios linfáticos, mas também do baço e da MO, assim como do trato gastrointestinal (TGI) e do anel de Waldeyer (89,90). É uma patologia rara representando 3-10% dos Linfomas não Hodgkin (NHL). Tem um curso clínico agressivo com média de sobrevida após diagnóstico de 3 a 5 anos. Ao diagnóstico, a idade média de incidência é de 60 anos e existe um predomínio dos homens sobre as mulheres (2:1) (89,91). A maior parte dos doentes apresenta adenopatias acompanhadas por hepatoesplenomegalia e envolvimento da MO. O envolvimento do SP é comum e por vezes ocorre leucocitose com linfocitose (3).

Quanto à morfologia, as células neoplásicas são linfócitos de tamanho pequeno a médio com contornos nucleares irregulares, cromatina ligeiramente dispersa, nucléolo geralmente não evidente e citoplasma escasso. Também podem estar presentes histiócitos (3,92,93).

Nos gânglios linfáticos, baço e anel de Waldeyer as células neoplásicas dão origem a um infiltrado com padrão de crescimento frequentemente difuso, ou nodular e raramente de zona de manto. De facto, as biopsias demonstram que estes padrões correspondem ao avanço da doença. Em fases precoces, as células neoplásicas substituem as zonas de manto, depois invadem o centro germinativo produzindo um padrão nodular e finalmente os nódulos fundem-se causando um padrão difuso (93).

Além dos diferentes padrões de crescimento existem 4 variantes citológicas de MCL: tipo célula pequena – núcleo pequeno redondo ou ligeiramente dentado com cromatina densa, imitando B-CLL; tipo pleomórfico – mistura de células neoplásicas com diferentes tamanhos e formas, cromatina nuclear emplumada e quantidade moderada de citoplasma; tipo blástico – blastos pequenos a médios com cromatina dispersa e citoplasma estreito; tipo zona marginal – constituído por um foco de células com citoplasma abundante pálido semelhantes a células B de zona marginal. A importância destas variantes ainda está em debate. No entanto, pensa-se que a variante blástica tem um curso clínico mais agressivo do que a forma clássica, tornando-se importante a distinção (93,94).

Análise imunofenotípica por CF revela que as células neoplásicas expressam marcadores normais de células B: CD19, CD20, CD22, FMC7 e imunoglobulinas de membrana com intensidade forte, IgM ou IgD, com restrição da cadeias leves *lambda* mais frequente do que *kappa* (92,95,96). Para além disso, expressam CD5, CD43, ciclina D1 e bcl-2 (93,96,97). O CD23 é geralmente negativo mas pode ser positivo fraco nalguns casos (98,99). As células neoplásicas são negativas para CD10 e bcl-6, marcadores associados a células B do centro germinativo (100).

Recentemente, o SOX11, um fator de transcrição neuronal, tem sido usado para identificar casos MCL em que a ciclina D1 é negativa. Este marcador é expresso nas células B neoplásicas do MCL sendo geralmente negativo nos outros linfomas (101,102).

Relativamente à análise citogenética por FISH, existe uma alteração genética presente em quase todos os casos de MCL que é t (11;14). Desta translocação resulta a justaposição do gene ciclina D1, no cromossoma 11, com o gene IGH, no cromossoma 14, resultando um aumento da expressão de ciclina D1, que leva a desregulação do ciclo celular e ativação de mecanismos de sobrevivência celular, contribuindo para a patogenia da doença (96). Em menor percentagem, encontram-se outras alterações genéticas com

ou sem valor de prognóstico associado: ganho 7p21 (16-34% dos casos), ganho 8q24 (16-36% dos casos), del1p13-p31 (29-52% dos casos), del6q23-q27 (23-38% dos casos), del11q22-q23 (21-59% dos casos), del13q11-q13 (22-55% dos casos), del13q14-q34 (43-51% dos casos), del17p13-pter (43-51% dos casos) que não têm valor de prognóstico. E ganho 3q26 (31-50% dos casos), del9p21 (18-31% dos casos), trissomia 12 (25% dos casos); raros casos com t (8;14) (MYC) associados a prognóstico desfavorável (3). Esta translocação envolvendo o gene MYC, resulta na expressão aumentada da proteína MYC que afeta várias funções celulares incluindo a regulação do ciclo celular, apoptose, metabolismo, adesão e diferenciação celular (103).

1.3.7 Linfocitose Persistente Policlonal de Linfócitos B Binucleados

Inicialmente descrita em 1982, a linfocitose B policlonal de linfócitos binucleados (PPBL, *persistent polyclonal B lymphocytosis with binucleated lymphocytes*) é uma patologia rara caracterizada por linfocitose B policlonal no SP persistente, estável e crônica sem anemia ou trombocitopenia, e níveis elevados de IgM no soro (104). Afeta predominantemente mulheres fumadoras (105). A idade média de incidência é entre os 40 e os 50 anos. A maior parte dos doentes está assintomática, sendo observada esplenomegalia ligeira em 10% dos casos. Cursa com linfocitose, enquanto a contagem de neutrófilos e plaquetas se encontram em níveis normais (106).

A análise morfológica revela uma população de células linfóides composta predominantemente por linfócitos atípicos com citoplasma abundante e núcleo maduro. Uma percentagem variável destes linfócitos apresenta o núcleo bilobado, uma característica desta patologia (107).

Estudos histológicos revelam que no baço existe expansão dos nódulos da polpa branca, à custa de linfócitos pequenos. Também é observada infiltração massiva da polpa vermelha por linfócitos com as mesmas características, que se localizam nos cordões esplênicos e dentro dos sinusóides, onde ocasionalmente podem ser observados linfócitos binucleados com expansão de nódulos da polpa (3,108). A MO, quando envolvida, tem uma pequena infiltração de linfócitos, raramente excedendo 10-15%, geralmente presentes nos sinusóides (109).

A análise imunofenotípica por CF demonstra que a linfocitose tem origem em célula B, uma vez que expressam CD19, CD20, CD22, CD79b, FMC7 e imunoglobulinas de membrana, especialmente IgM e IgD, com uma razão kappa:lambda normal. Caracteristicamente expressam CD18, CD25, CD27 e bcl-2 e são negativas para CD5, CD10, CD23, CD31, CD38, CD43 e ciclina D1 (107,109).

A patogenia da doença não é conhecida (110) e a análise citogenética por FISH descreve a anomalia +i (3q) em 70% dos casos. Em menor percentagem também se observa rearranjos bcl-2 e trissomia 3 (106,111,112).

1.3.8 Linfoma de Burkitt

O linfoma de Burkitt (BL, *Burkitt Lymphoma*) é uma neoplasia agressiva de células B, descrita pela primeira vez por Dennis Burkitt em 1958. Representa aproximadamente 2.5% dos NHL em adultos e envolve preferencialmente locais extraganglionares, como o intestino delgado e o maxilar. A distinção entre BL e outros linfomas de alto grau é clinicamente importante, não só porque o BL tem uma taxa de proliferação muito alta, mas também porque os doentes estão em risco de envolvimento do sistema nervoso central (SNC) (113,114).

São conhecidas 3 variantes clínicas de BL: endêmico, esporádico e associado a imunodeficiência.

O BL endêmico ocorre na África Equatorial, representando a patologia mais comum em crianças nesta área, com um pico de incidência dos 4 aos 7 anos e uma razão homem:mulher de 2:1. Cursa com tumor ósseo ou facial em 50% dos casos, mas também pode afetar outros locais como mesentério, ovários, testículos, rim, mama e meninges. Representa 30 a 50% dos linfomas em crianças e está associado com vírus EBV (*Epstein-Barr virus*) (3,113,114).

O BL esporádico ocorre por todo o mundo, principalmente em crianças e adultos jovens. A incidência é baixa representando apenas 1-2% dos linfomas da Europa Ocidental e Estados Unidos da América. A idade média dos doentes adultos é 30 anos. A razão homem:mulher é de 2 ou 3:1, e em crianças esta razão é ainda mais acentuada. Pode envolver vários órgãos como o tubo digestivo (intestino delgado, estômago, cego), mesentério, rim, testículos, ovários e mama. Alguns casos têm envolvimento dos ossos da face (25%), e também da medula óssea e do sistema nervoso central (30 e 15% dos casos). Os sinais e sintomas podem incluir obstrução intestinal ou hemorragia gastrointestinal. Apenas 30% destes casos estão associados com EBV(3,113,114).

Finalmente, o BL associado a imunodeficiência é encontrado em associação com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) mas não em outras formas de imunossupressão. A apresentação ganglionar é frequente, assim como envolvimento da MO (3,113,114).

Além destas variantes, existem 2 formas morfológicas: o BL com diferenciação plasmocitária mais frequente no BL associado a imunodeficiência, em que as células neoplásicas núcleo excêntrico e um único nucléolo característico de plasmócito e o BL

atípico em que as células são grandes e mais pleomórficas; esta forma é mais comum nos adultos (2).

As células neoplásicas típicas são de tamanho médio com núcleo redondo, cromatina relativamente condensada, nucléolos múltiplos e citoplasma basófilo que geralmente contém vacúolos lipídicos.

Na MO, o padrão de infiltração é difuso e monótono, com uma aparência de céu estrelado característico (*starry sky*) devido à presença de inúmeros macrófagos contendo células apoptóticas no seu interior (116,117).

A análise por CF revela que as células neoplásicas expressam marcadores de linfócitos B: CD19, CD20, CD22, CD79a e imunoglobulinas de membrana, geralmente IgM com restrição de cadeias leves (*kappa* ou *lambda*). Expressam caracteristicamente CD10, CD38, CD43, CD77 e bcl-6, sem evidência de rearranjos no gene BCL-6. A expressão de bcl-2 é fraca ou ausente. Além disso, são negativas para CD5, CD23, CD34 e TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*). O CD18 e CD54 tem expressão muito fraca ou ausente e o CD44 é geralmente negativo. Pensa-se que as células neoplásicas derivam do centro germinativo, por expressarem CD10 e bcl-6 (3,118,119,120).

A análise citogenética por FISH revela que todos os tipos de BL possuem translocação entre o cromossoma 8 e um de três cromossomas: 2,14 ou 22. Cerca de 80% dos casos apresenta t (8;14) que justapõe o gene MYC ao locus IGH, levando ao aumento da expressão da proteína MYC. Nos outros 20%, ocorre t (2;8) e t (8;22) que justapõe o gene MYC ao locus dos genes que codificam para as cadeias leves das imunoglobulinas, *kappa* (IGK) ou *lambda* (IGL), respetivamente (121,122). Como já foi referido, o MYC é um fator de transcrição que influencia a transcrição de uma variedade de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, apoptose, crescimento, adesão e diferenciação celular (115). Em alguns casos existem outras alterações genéticas associadas: 13q, associada com prognóstico desfavorável em crianças mas não em adultos; 17p associada com prognóstico desfavorável em adultos (122,123).

1.3.9 Linfoma Difuso de Células B Grandes

O linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, *Diffuse Large B Cell Lymphoma*) é uma neoplasia de linfócitos B comum, representando 25-30% dos NHL nos adultos em países ocidentais e em países em desenvolvimento (1). É mais comum em idosos com idade média de incidência de 70 anos. No entanto, pode aparecer numa grande gama de idades, sendo bastante heterogênea na histologia, imunofenótipo, resposta ao tratamento e clínica. Apesar de estar associada a uma sobrevida curta em doentes não tratados, a

neoplasia pode ter remissão completa com tratamento adequado. Ocorre nos homens com ligeira predominância sobre as mulheres (124,125).

É uma patologia que pode surgir *de novo* ou resultar da transformação de linfomas de “baixo grau” como a B-CLL ou o FL. Tipicamente apresenta envolvimento ganglionar, mas também pode envolver outros órgãos como TGI, ossos, testículos, baço, anel de Waldeyer, glândulas salivares, tiróide, fígado, rim e glândulas suprarrenais. O envolvimento da MO ocorre em 11 a 27% dos casos e 1/3 destes tem envolvimento de SP. O envolvimento da MO significa muitas vezes estadio avançado da doença. Quando existem, os sinais e sintomas são muito variáveis dependendo do local de envolvimento. Cerca de 30% dos doentes apresenta febre, perda de peso e sudorese noturna (3,126).

A neoplasia é muito heterogênea apresentando 3 variantes morfológicas: centroblástica, imunoblástica e anaplásica. A variante centroblástica a forma mais comum. A célula predominante é o centroblasto – linfócito grande com núcleo redondo ou oval, cromatina vesicular, nucléolos periféricos e citoplasma basófilo. Nalguns casos, o tumor é monomórfico, isto é, composto inteiramente (mais de 90%) por centroblastos. Geralmente é polimórfico com mistura de centroblastos e imunoblastos. Na variante imunoblástica mais de 90% das células são imunoblastos – linfócitos B imaturos com núcleo grande, um único nucléolo central e citoplasma basófilo. A variante anaplásica caracteriza-se, como o próprio nome indica, pela presença de células anaplásicas arredondadas, ovais ou poligonais, com núcleo pleomórfico e aspeto bizarro (3).

Além desta divisão, existe outra de acordo com expressão genética e imunofenotípica: subtipos GCB (*germinal center B cell like*) e ABC (*activated B cell like*). O subtipo GCB está associado com expressão de CD10, bcl-6 e rearranjos bcl-2 e são frequentes os ganhos 1q, 2p, 7q e 12q. A maior parte é de variante centroblástica e está associado com melhor prognóstico. O subtipo ABC associa-se com expressão de MUM1/IRF4, um membro da família de genes de fatores reguladores que tem um papel importante na regulação da expressão génica em resposta à sinalização por interferão e citocinas, CD5 e CD138. A maior parte é de variante imunoblástica e está associado com prognóstico desfavorável. Do ponto de vista citogenético caracteriza-se pelos ganhos 3q,18q e 19q e perdas 6q e 9p (127,128,129).

Os estudos histológicos mostram um infiltrado difuso de células grandes. O envolvimento ganglionar parcial pode ser interfolicular ou mais raramente sinusoidal (3).

A análise imunofenotípica por CF revela que as células neoplásicas expressam marcadores de linfócitos B CD19, CD20, CD22, CD79a e imunoglobulinas de membrana, geralmente IgM com restrição de cadeias leves (130). O bcl-2 é expresso em 80% e bcl-6 em 70% dos casos. O CD10 é positivo em 30 a 60% e está associado com morfologia

centroblástica. O MUM1/IRF4 é positivo em 35 a 65% dos casos e está associado com morfologia imunoblástica (127,128,129,131). O CD30 quando positivo é associado com a variante anaplásica. O significado deste marcador nos DLBCL permanece desconhecido (132). O CD5 é geralmente negativo, mas quando é expresso está associado com subtipo ABC, idade avançada, prognóstico desfavorável e curso clínico agressivo (133). O CD56 é positivo em menos de 10% dos DLBCL, estando associado com envolvimento extraganglionar (134).

A análise citogenética por FISH não tem evidenciado alterações recorrentes específicas dos DLBCL. No entanto, foram descritos rearranjos do gene BCL6 em 30% dos casos; t(14;18) em 20% dos casos; e rearranjos do gene MYC em 10% dos casos associado com prognóstico desfavorável (135,136,137). Outras alterações que têm sido encontradas são 14q32, 18q21, 1q21, 3q27, 1q36, 8q24, 3p21, 6q21, 1p22 e 22q11 (3).

2 OBJETIVOS

Durante este estudo no LC, tive oportunidade de participar na avaliação de várias doenças hematológicas, salientando, pela sua frequência, as DLP-B.

A construção de um Atlas *online* com os perfis imunofenotípicos de doenças hemato-oncológicas é uma ferramenta muito útil futuramente para todos os especialistas, uma vez que além de facilitar a consulta e o acesso ser global, permite também uma atualização rápida à medida que novas informações se encontrem disponíveis.

Existem já outros Atlas *online*, cuja função é ajudar e informar todos aqueles que necessitam, como por exemplo o *Atlas online de Medicina Legal* ou *Atlas Asclépio de Anatomia Humana*, que constituem ferramentas de consulta muito úteis e rápidas.

O objetivo deste trabalho foi, através do estudo de casos clínicos típicos de DLP-B, selecionados de entre os casos estudados no Laboratório de Citometria contribuir para a elaboração futura de um Atlas de Hematologia. Para além de, a propósito de cada patologia, se fazer um breve resumo das suas principais características, apresenta-se o imunofenótipo de cada caso selecionado e os aspetos morfológicos que ajudaram a fundamentar o diagnóstico, documentando, sempre que possível, com imagens ilustrativas dos mesmos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

Amostras: Amostras de sangue periférico, medula óssea ou líquidos biológicos colhidos em tubo com EDTA-K3 (4.5 ml), com a concentração de células ajustada a 5.000-10.000/μl.

Equipamento: Centrífuga; Citómetros de fluxo FACScanto II (Becton Dickinson); Vortex

Material: Lâminas de vidro, pipetas Pasteur, tubos de 5 ml (12x 75 mm), tubos de 15 ml fundo cônico, suporte para os tubos.

Reagentes: Solução de Leishman; PBS-Az (0.1%) (tampão fosfato salino com azida 0.1 gramas / 100 ml); PBS-BSA (2%) -Az (0.1%) (tampão fosfato salino com albumina bovina 2 gramas / 100 ml e azida 0.1 gramas / 100 ml); Lymphoprep AXIS-SHIELD Oslo, Norway; FACS Lysing Solution (BD, Ref 92-0002); Fix & Perm (Caltag; Ref GAS-004).

3.1.1 Execução de esfregaços

1. Homogeneizar a amostra (sangue ou medula óssea) no agitador de tubos de Hematologia.
2. Identificar a lâmina de vidro.
3. Colocar uma gota de amostra (cerca de 5μl) a cerca de 1cm de uma extremidade da lâmina identificada.
4. Apoiar o bordo de uma segunda lâmina de vidro sobre a primeira aproximadamente a meio, com uma inclinação de 45°.
5. Puxar suavemente para trás a segunda lâmina de bordos esmerilados até tocar na gota de amostra permitindo que esta se espalhe horizontalmente no bordo (procurando que não atinja os cantos).
6. Mantendo a segunda lâmina com uma inclinação de cerca de 45°, deslizar suavemente para a frente, ao longo da primeira lâmina, de modo a espalhar a amostra numa camada firme e uniforme. Não efetuar uma pressão exagerada para não induzir artefactos.
7. Secar o esfregaço à temperatura ambiente em posição horizontal.

3.1.2 Coloração de esfregaços

1. Colocar a lâmina do esfregaço sobre um suporte perfeitamente horizontal.
2. Cobrir a lâmina com reagente de Leishman (5 gotas).
3. Deixar atuar durante 2 minutos para permitir fixação.
4. Adicionar água destilada a pH 6.8 (5 gotas).
5. Misturar a água com corante, procurando não transbordar.
6. Deixar atuar 7 a 10 minutos.

7. Lavar com água destilada abundante.
8. Remover o excesso de água com papel absorvente.
9. Limpar o corante no verso da lâmina, com ajuda de algodão.
10. Deixar secar ao ar.

3.1.3 Imunofenotipagem de linfócitos

3.1.3.1 Imunofenotipagem de antígenos expressos nas membranas das células

1. Identificar os tubos.
2. Pipetar o volume adequado de cada anticorpo.
3. Adicionar 100 µl de amostra.
4. Agitar no vortex.
5. Incubar à temperatura ambiente no escuro durante 15 minutos.
6. Juntar 2 ml de solução de lise (*FACSlysing Solution*, previamente diluído).
7. Agitar no vortex (2 segundos).
8. Incubar à temperatura ambiente no escuro, durante o tempo necessário para que ocorra hemólise (5-10 minutos).
9. Centrifugar a 300 xg durante 5 minutos, em centrífuga refrigerada.
10. Rejeitar o sobrenadante por decantação rápida ou aspiração por bomba de vácuo e suspender o botão de células por agitação.
11. Adicionar cerca de 4 ml de PBS-Az (0.1%).
12. Centrifugar a 300 xg durante 5 minutos, em centrífuga refrigerada.
13. Rejeitar o sobrenadante por decantação rápida.
14. Suspender o botão de células por agitação.
15. Adicionar 500 µl de PBS-Az (0.1%).
16. Fazer a leitura no citômetro.

3.1.3.2 Imunofenotipagem de antígenos expressos no citoplasma das células

1. Identificar os tubos.
2. Pipetar a quantidade adequada dos anticorpos monoclonais destinados à marcação de antígenos expressos na membrana das células, tendo o cuidado de o depositar no fundo do tubo.
3. Adicionar 100 µl de amostra.
4. Agitar no vortex (2 segundos).
5. Incubar a temperatura ambiente e no escuro durante 15 minutos.
6. Adicionar cerca de 4 ml de PBS-Az (0.1%).
7. Centrifugar a 300-350 xg durante 5 minutos, em centrífuga refrigerada.
8. Rejeitar o sobrenadante por aspiração, bomba de vácuo ou decantação rápida e suspender o botão de células por agitação.

9. Repetir lavagem
10. Juntar 100 µl de FIX & PERM – reagente A.
11. Agitar no vortex (2 segundos).
12. Incubar 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro.
13. Centrifugar a 300-350 xg durante 5 minutos, em centrífuga refrigerada.
14. Rejeitar o sobrenadante por aspiração bomba de vácuo ou decantação rápida e suspender o botão de células por agitação.
15. Adicionar 100 µl de FIX & PERM (reagente B) sobre a “pellet” suspendida.
16. Pipetar a quantidade adequada dos anticorpos monoclonais destinados à marcação de antígenos expressos no interior das células, tendo o cuidado de o depositar no fundo do tubo.
17. Agitar no vortex (baixa velocidade).
18. Incubar 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro.
19. Centrifugar a 300-350 xg durante 5 minutos, em centrífuga refrigerada.
20. Adicionar cerca de 4 ml de PBS-Az (0.1%).
21. Centrifugar nas mesmas condições.
22. Rejeitar o sobrenadante por aspiração bomba de vácuo ou decantação rápida e suspender o botão de células por agitação.
23. Adicionar cerca de 500 µl de PBS-Az (0.1%).
24. Fazer a leitura no citómetro.

3.1.4 Procedimentos complementares

3.1.4.1 Separação de células mononucleadas em gradiente de densidade

1. Diluir a amostra até obter a concentração desejada de leucócitos (cerca de 10.000/mm³).
2. Com uma pipeta Pasteur, colocar 3 ml de Lymphoprep (AXIS-SHIELD Oslo, Norway) em tubo de 15 ml de fundo cônico.
3. Com outra pipeta Pasteur, depositar em cima do Lymphoprep 2 ml da suspensão de células
4. Centrifugar a 800 xg durante 15-20 minutos, à temperatura ambiente, tendo o cuidado de desligar o travão da centrífuga, de verificar a temperatura e de calibrar bem os tubos.
5. No final da centrifugação retirar o tubo cuidadosamente da centrífuga, sem misturar as fases.
6. Com uma pipeta Pasteur, aspirar o anel de células mononucleadas presente na interfase entre o Lymphoprep e o plasma, fazendo movimentos circulares em

torno do tubo à medida que vai aspirando, cuidadosamente, para não misturar as fases.

7. Transferir as células mononucleadas recuperadas em tubo de plástico de 5 ml e adicionar cerca de 4 ml PBS-Az (0.1%).
8. Centrifugar Centrifugar a 300-350 xg, durante 5 minutos, à temperatura ambiente.
9. Remover o sobrenadante por decantação rápida, suspender o botão de células e lavar mais duas vezes em PBS-Az (0.1%), nas mesmas condições.
10. Remover o sobrenadante por decantação rápida e suspender o botão de células em cerca de 0.5 ml de PBS-BSA (2%) -Az (0.1%).

4. RESULTADOS/DISCUSSÃO

4.1 CASOS CLÍNICOS SELECIONADOS

Seguidamente procede-se à apresentação de 16 casos de DLP-B selecionados do LC durante a realização deste estudo, assim como as suas características clínicas, morfológicas e imunofenotípicas.

4.1.1 LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA B

4.1.1.1 Enquadramento teórico

Clínica: A leucemia linfocítica crónica B (B-CLL, *B-cell chronic lymphocytic leukemia*) é uma neoplasia de linfócitos B maduros que se acumulam no sangue periférico, medula óssea, baço e gânglios linfáticos. É a leucemia mais comum em adultos nos Países Ocidentais, afetando mais homens do que mulheres e aumentando a incidência com a idade. Na maioria dos casos os doentes estão assintomáticos na data do diagnóstico e cada vez com mais frequência a patologia é descoberta em exames de rotina. Quando há sinais e sintomas, estes podem incluir adenopatias, esplenomegalia, hepatomegalia, febre, perda de peso, fadiga e infeções.

Caraterísticas morfológicas: Nos casos típicos, a célula predominante é o linfócito pequeno, com núcleo redondo, cromatina condensada, e citoplasma escasso. No sangue periférico, observam-se frequentemente sombras de Gumprecht. Em alguns casos podem ser observadas células linfóides com morfologia atípica, nomeadamente prolinfócitos. Quando estas células excedem 15% dos linfócitos circulantes a B-CLL é designada "atípica". Se a percentagem de prolinfócitos for superior a 55% designa-se por Leucemia Prolinfocítica.

Caraterísticas fenotípicas: As células linfóides neoplásicas são CD19+, CD20+ (fraco) e CD22+ (fraco) e expressam carateristicamente CD5 e CD23. O FMC7 e o CD79b são geralmente negativos ou positivos fracos. O CD10 é negativo. A expressão de CD38 (mais de 30% das células) e/ou de ZAP-70 (mais de 20% das células) associa-se a prognóstico desfavorável.

Caraterísticas genéticas: Cerca de 80% dos casos cursam com alterações citogenéticas e algumas destas alterações permitem identificar grupos de doentes com prognóstico distinto: bom prognóstico – del 13q (mais de 40% dos casos); mau prognóstico – del 11q (3-15% dos casos); del 17p (5-12% dos casos); del 6q (3-5% dos casos); del 14q (4-10% dos casos).

4.1.1.2 CASO 1. LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA B, típica

Informação clínica – Homem, 68 anos, com linfocitose persistente. Dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 e enfarte cerebral.

Imunofenotipagem (sangue periférico) – Os linfócitos B representam 79% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+, CD20+ fraco, CD5+ fraco, CD10-, CD38-, CD23+, FMC7-, CD79b+ fraco, CD11c variável, CD25+, CD103-, IgD+, cadeias leves *lambda*+ com fraca intensidade. (Figura 1).

Morfologia (esfregaço de sangue periférico) – Predomínio de linfócitos pequenos, com citoplasma escasso e cromatina condensada. Presença de sombra de Gumprecht. (Figura 2).

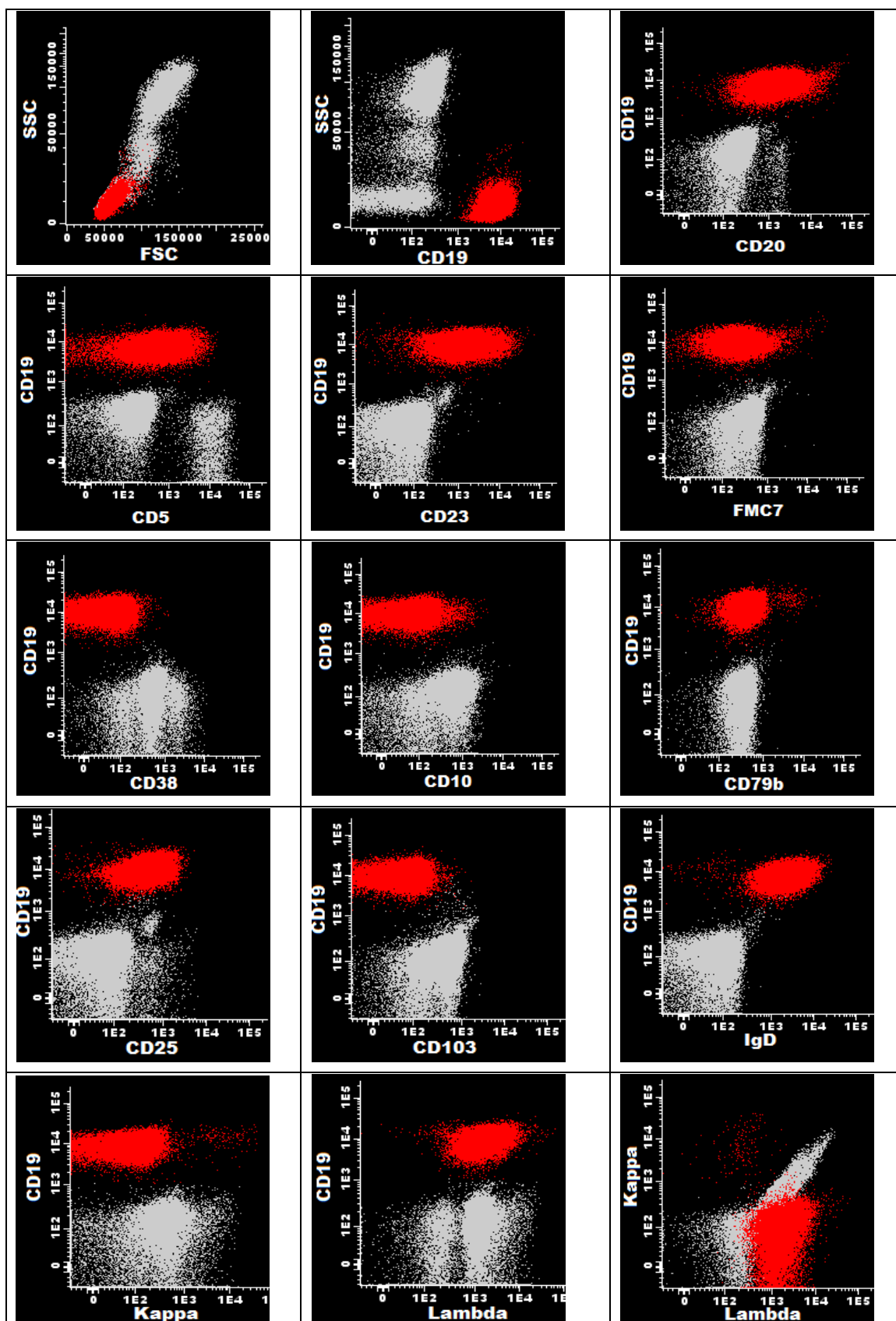


Figura 1. Dot plots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com leucemia linfocítica crónica B típica (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

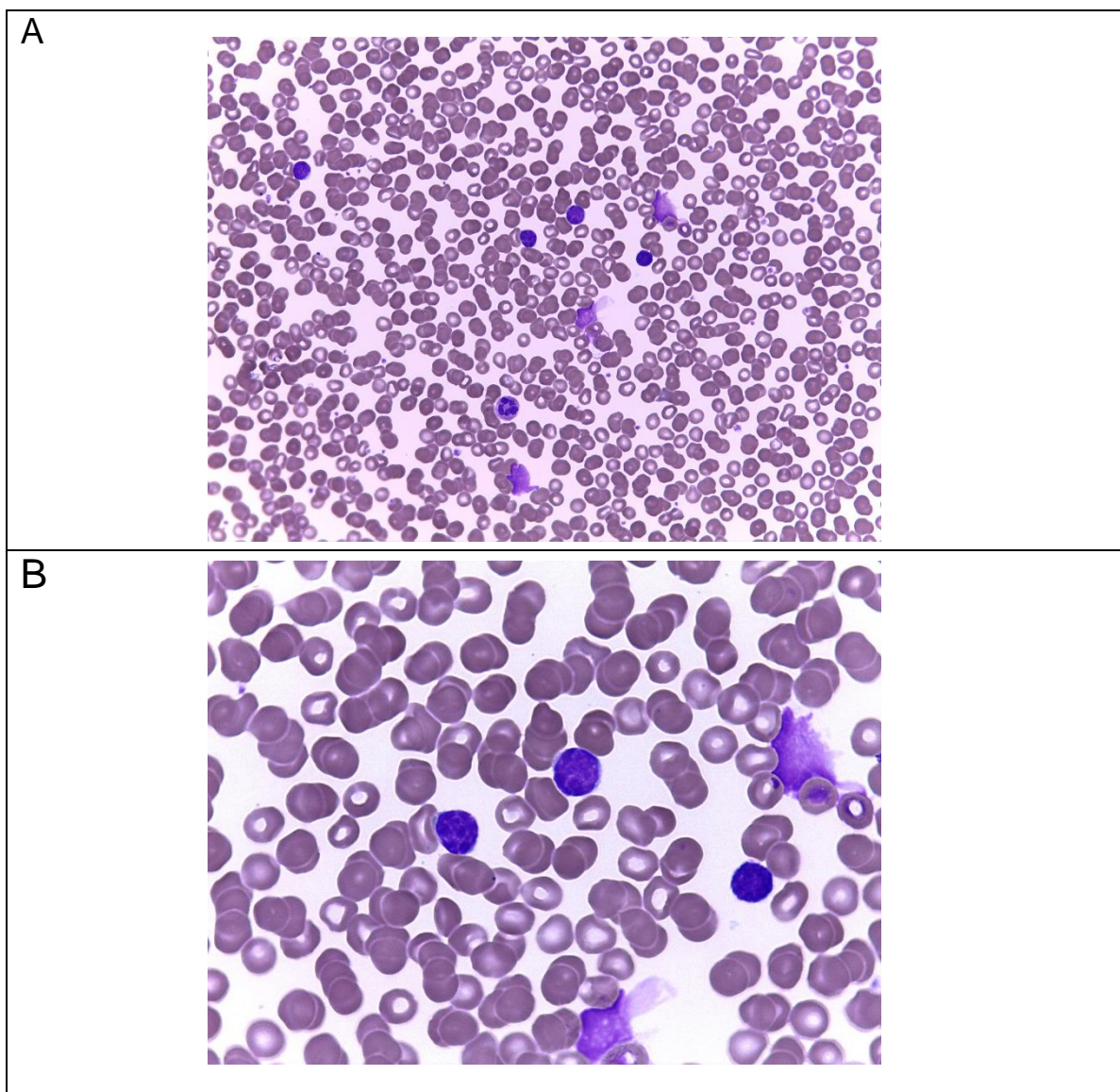


Figura 2 Esfregaço de sangue periférico de um doente com leucemia linfocítica crónica B típica (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)

4.1.1.3 CASO 2. LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA B, atípica

Informação clínica – Mulher, 67 anos. Linfocitose em estudo.

Imunofenotipagem (sangue periférico) – Os linfócitos B representam 72% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+, CD20+ fraco, CD5+, CD23+, FMC7-, CD79b+ fraco, CD11c variável, IgD+, cadeias leves *kappa*+ com intensidade fraca, CD38+, ZAP-70+ (figura 3).

Morfologia (esfregaço de sangue periférico) – Predomínio de linfócitos de tamanho médio com citoplasma relativamente abundante (figura 4).

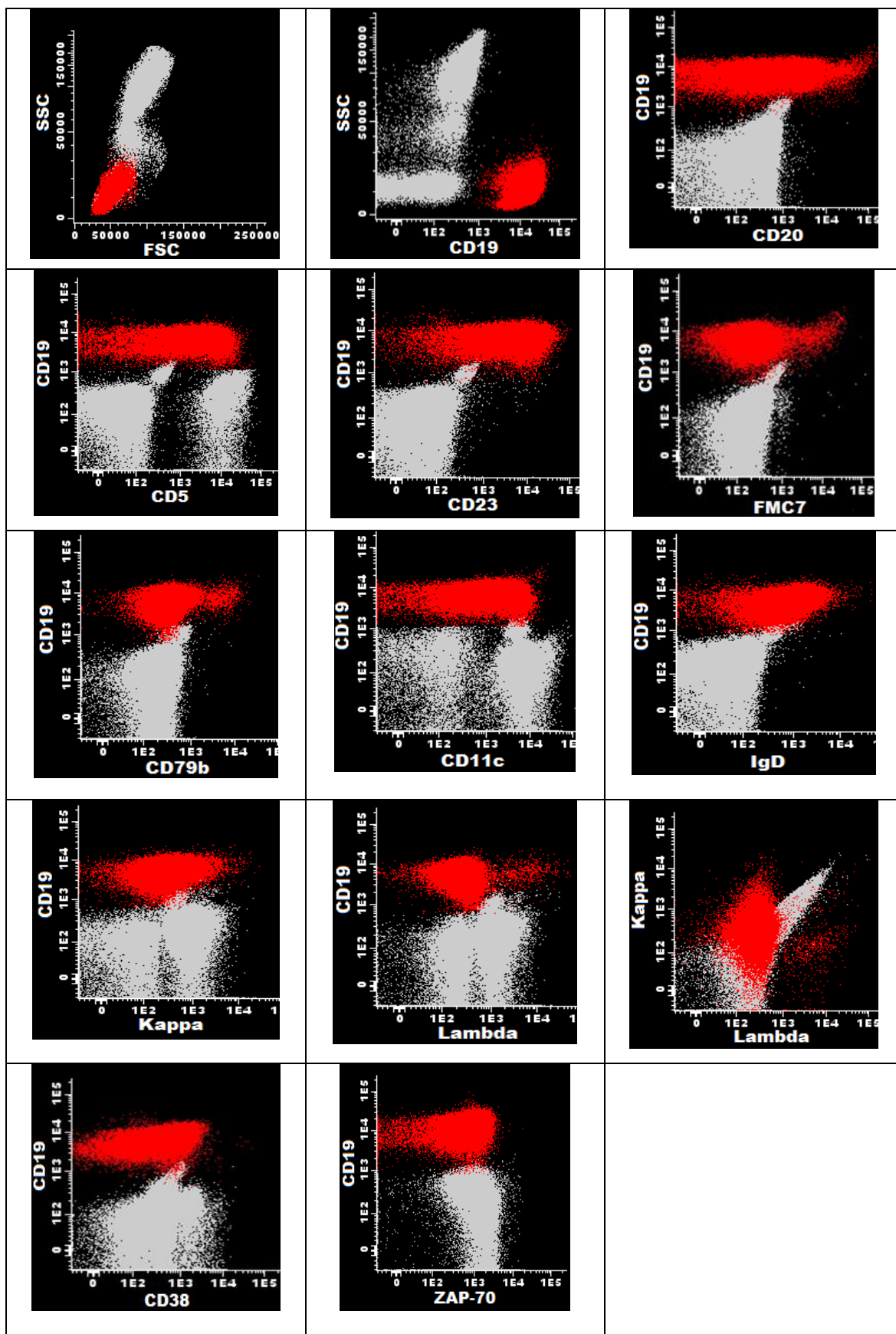


Figura 3 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com leucemia linfocítica crónica B atípica (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

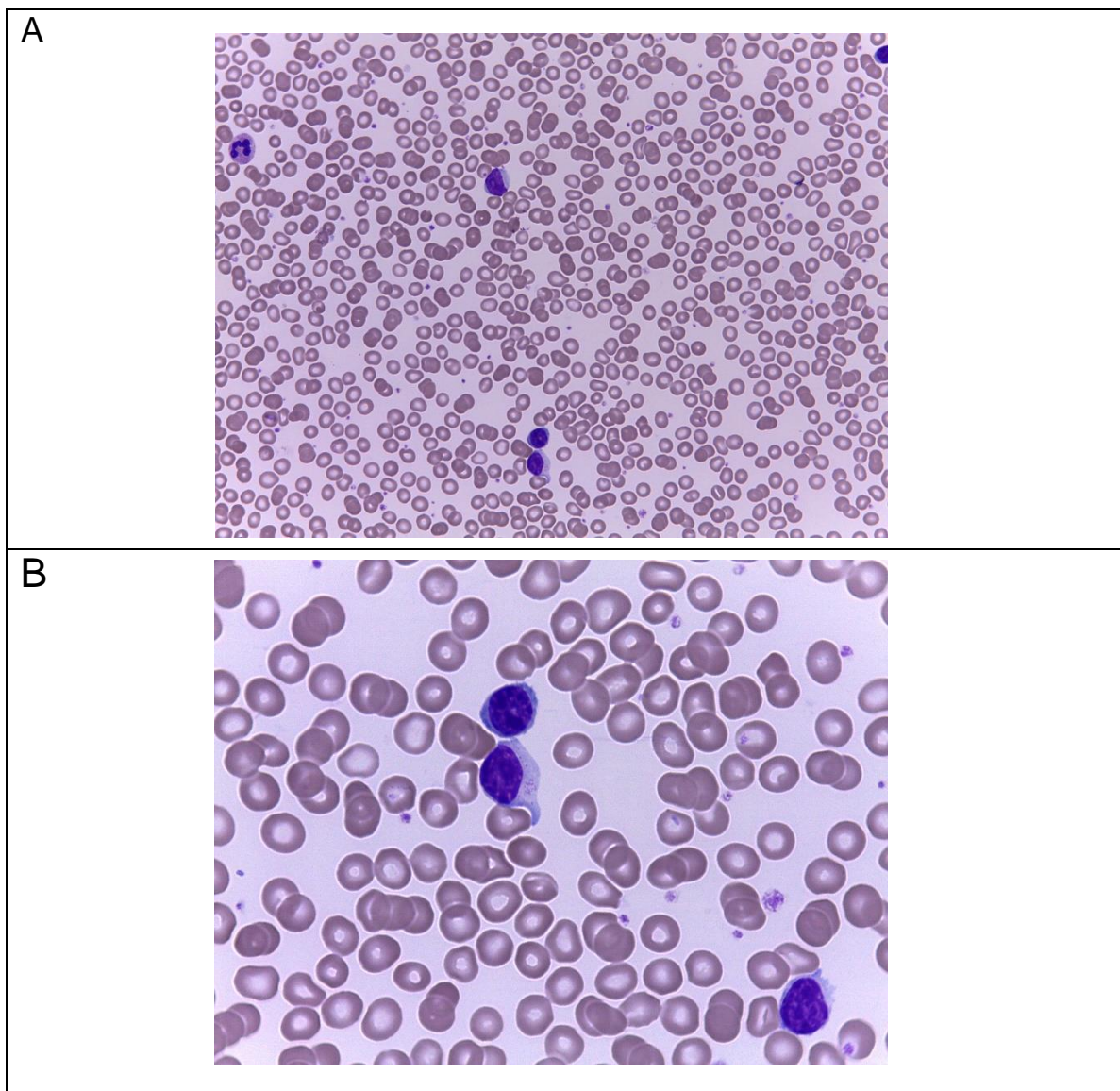


Figura 4 Esfregaço de sangue periférico de um doente com leucemia linfocítica crónica B atípica (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)

4.1.2 LINFOMA ESPLÉNICO DE CÉLULAS B DE ZONA MARGINAL

4.1.2.1 Enquadramento teórico

Clínica: O linfoma esplénico de células B de zona marginal (SMZL, *splenic marginal zone lymphoma*) é uma patologia rara, representando menos de 2% das neoplasias linfóides. A maior parte dos doentes tem idade superior a 50 anos e os homens são mais afetados do que as mulheres. Os doentes podem encontrar-se assintomáticos na data do diagnóstico. A esplenomegalia é frequente sendo por vezes acompanhada de hepatomegalia, mas raramente se observam adenomegalias. É comum haver leucocitose com linfocitose, anemia e trombocitopenia.

Caraterísticas histopatológicas: Os linfócitos B neoplásicos ocupam a polpa branca esplénica, invadindo e substituindo os folículos linfóides; na polpa vermelha, formam nódulos linfóides e infiltrados mais ou menos difusos, com invasão dos sinusóides.

Caraterísticas morfológicas: As células caraterísticas no sangue periférico são os linfócitos vilosos. Existem numa percentagem variável, tem tamanho médio e citoplasma moderadamente abundante com vilosidades citoplasmáticas que podem ter distribuição polar. Quando estão presentes, a doença é designada linfoma esplénico de células B da zona marginal com linfócitos vilosos circulantes (SLVL).

Caraterísticas fenotípicas: As células neoplásicas expressam CD19, CD20 (forte), CD22 (forte), CD79b e imunoglobulinas de membrana (geralmente IgM). O CD11c é expresso em cerca de metade dos casos, mas ao contrário do que acontece na leucemia de "hairy-cells", as células B neoplásicas não expressam CD25 nem CD103. O CD38 tem uma expressão variável. O CD5 em geral é negativo, podendo no entanto ser expresso em alguns casos. O CD10, o CD23 e a ciclina D1 são negativos.

Caraterísticas genéticas: A alteração genética mais comum é a del7q, descrita em cerca de 40% dos casos. Esta deleção está associada com prognóstico desfavorável.

4.1.2.2 CASO 3. LINFOMA ESPLÊNICO DE CÉLULAS B DE ZONA MARGINAL

Informação clínica – Mulher, 63 anos. Adenopatias abdominais, esplenomegalia; linfocitose com linfócitos atípicos.

Imunofenotipagem (sangue periférico) – Os linfócitos B representam 30% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+ muito forte, CD20+ muito forte, CD5-, CD10-, CD38-, CD23-, FMC7+ muito forte, CD79b+ fraco, CD11c+, CD25-, CD103 variável, cadeias leves kappa+ (figura 5).

Morfologia (esfregaço de sangue periférico) – Presença de linfócitos vilosos com tamanho médio e citoplasma moderadamente abundante com vilosidades citoplasmáticas que podem ter distribuição polar (figura 6).

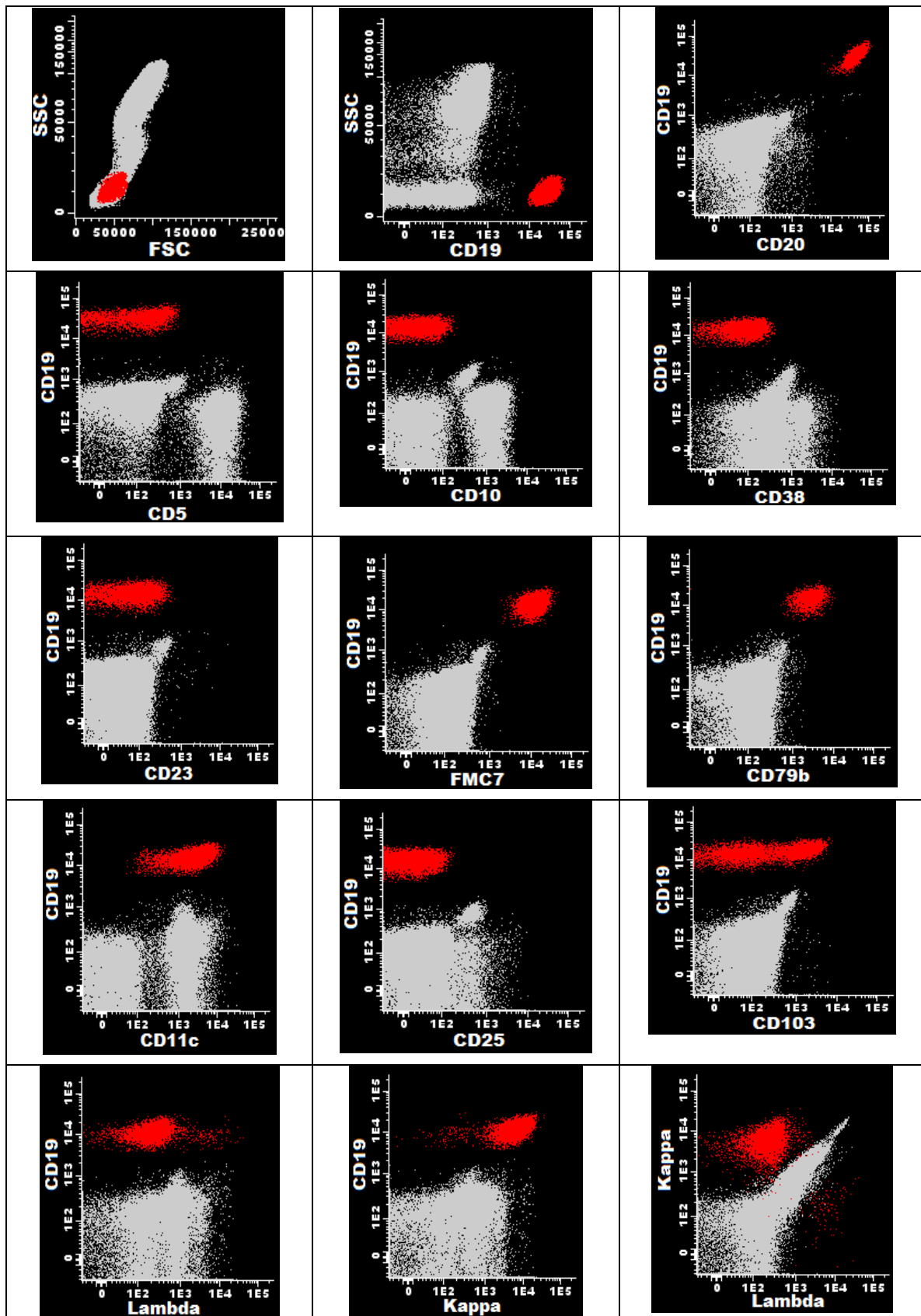


Figura 5 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com linfoma esplênico de células B da zona marginal (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

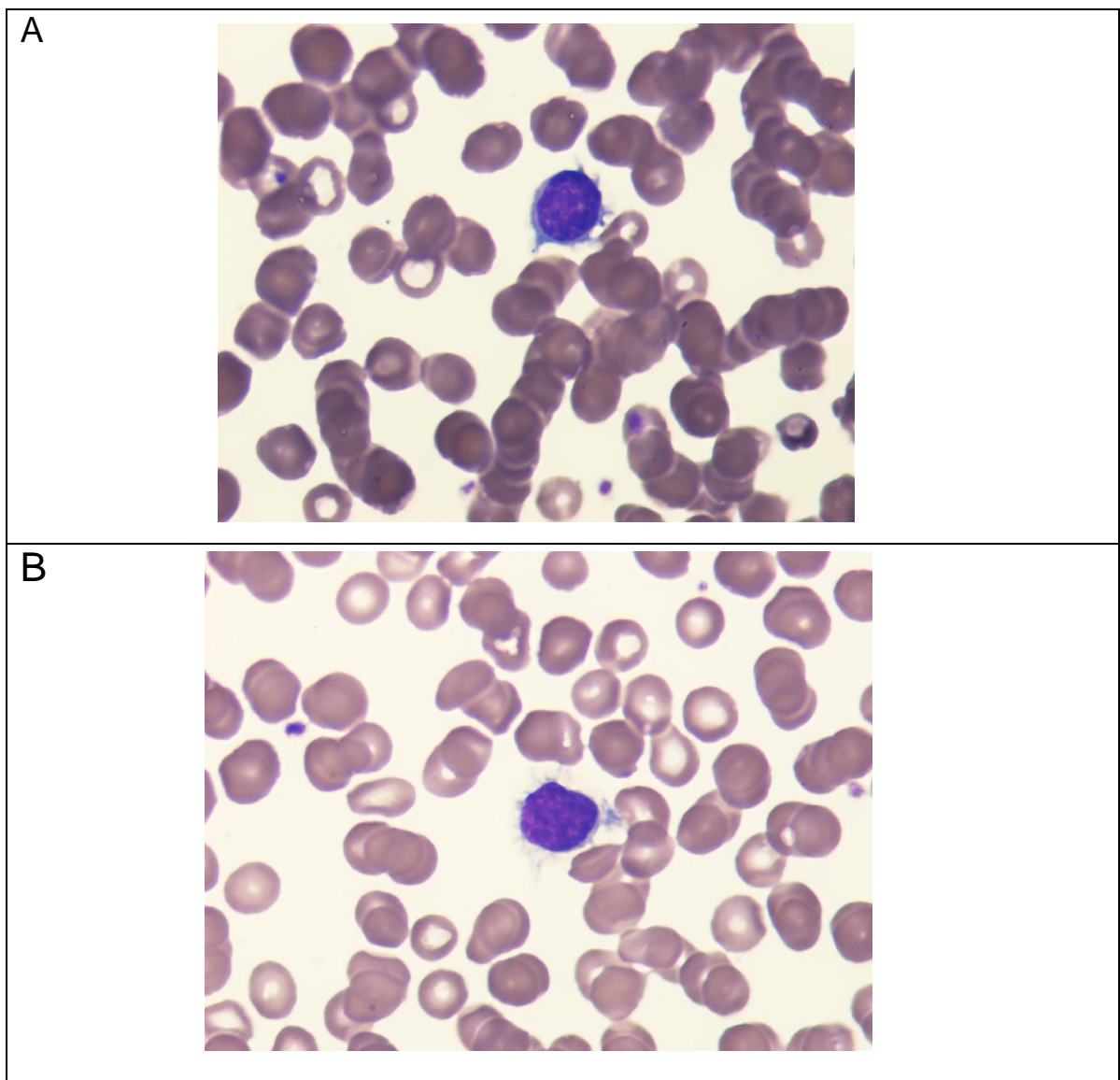


Figura 6 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfoma esplênico de células B da zona marginal (coloração de Leishman; painel A, 100x; painel B, 100x)

4.1.3 LEUCEMIA DE CÉLULAS CABELUDAS / LEUCEMIA DE “*HAIRY CELLS*”

4.1.3.1 Enquadramento teórico

Clínica: A leucemia de *hairy cells* (HCL, *hairy cell leukemia*), também conhecida por “leucemia de células cabeludas” ou “tricoleucemia”, é uma neoplasia de células B maduras rara (2% das neoplasias linfóides) que envolve o sangue periférico, a medula óssea e o baço. Atinge fundamentalmente indivíduos do sexo masculino (4:1) e tem incidência é máxima após os 45 anos. O principal sinal é esplenomegalia, acompanhada com frequência de hepatomegalia, e são frequentes as citopenias. Podem ocorrer complicações infecciosas relacionadas com a neutropenia e com a monocitopenia, assim como fadiga e hemorragias associadas a anemia e a trombocitopenia, respetivamente.

Caraterísticas morfológicas: As células linfóides têm tamanho médio a grande. O citoplasma é abundante, de contorno irregular, com numerosas vilosidades citoplasmáticas e ocasionalmente pode conter vacúolos ou inclusões. O núcleo é oval ou reniforme, cromatina homogênea, podendo ter nucléolo visível. Do ponto de vista imunocitoquímico, é típica a positividade para a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, *tartarate resistant acid phosphatase*).

Caraterísticas fenotípicas: As células neoplásicas expressam CD19, CD20 (forte), CD22 (forte), CD79b e FMC7, são carateristicamente positivos para CD11c, CD25, CD103 e CD123, e não expressam CD5 nem CD10. Nos estudos imunohistoquímicos é típica a expressão de anexina A1 (positiva na HCL e negativa nas restantes doenças linfoproliferativas de células B), sendo também observada positividade para T-bet, CD72 (DBA.44) e ciclina D1 (expressão fraca).

Caraterísticas genéticas: Não existem alterações genéticas comuns para HCL, tendo sido apenas descrito algumas anomalias nos cromossomas 5 e 7.

4.1.3.2 CASO 4. LEUCEMIA DE CÉLULAS CABELUDAS

Informação clínica – Mulher, 63 anos. Neutropenia e trombocitopenia.

Imunofenotipagem (aspirado medular) – Os linfócitos B representam 42% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+ forte, CD20+ forte, CD5-, CD10-, FMC7+ forte, CD38-, CD79b+, CD11c+ forte, CD25+, CD103+, IgM+, IgD+ e cadeias leves lambda+. (figura 7)

Morfologia (esfregaço de medula óssea) – Presença de células de tamanho grande com citoplasma abundante, de contorno irregular com numerosas vilosidades citoplasmáticas. (figura 8)

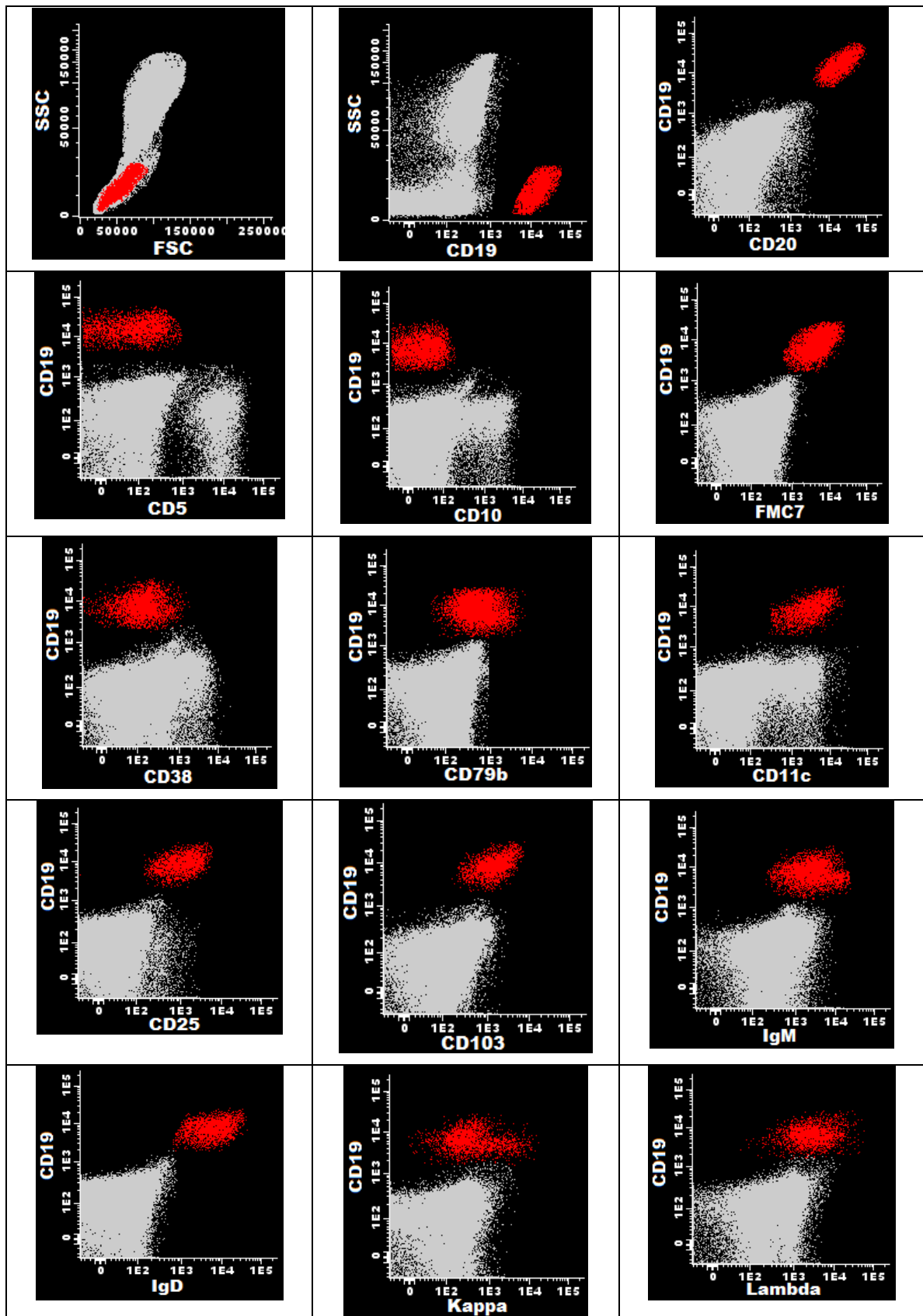


Figura 7 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células da medula óssea de um doente com tricoleucemia (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

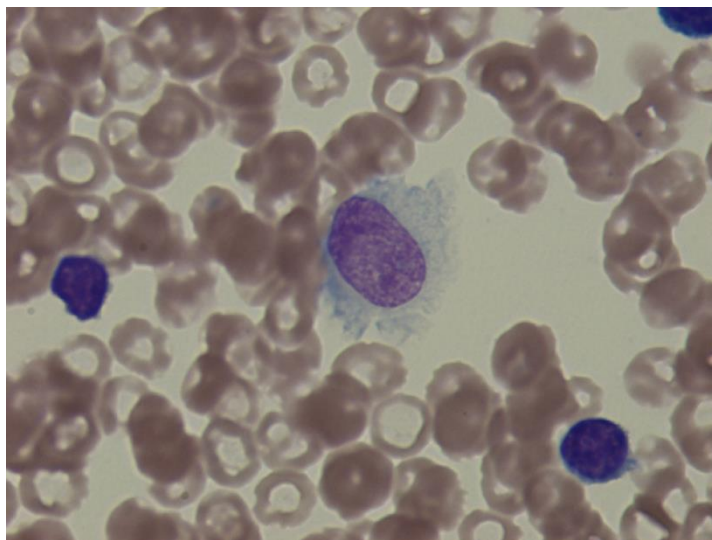


Figura 8 Esfregaço de medula óssea de um doente com tricoleucemia (coloração de Leishman; 100x)

4.1.3.3 CASO 5. LEUCEMIA DE CÉLULAS CABELUDAS

Informação clínica – Homem, 42 anos. Pancitopenia.

Imunofenotipagem (sangue periférico) – Os linfócitos B representam 18% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+ muito forte, CD20+ muito forte, CD5-, CD10-, CD38-, CD23+, FMC7+, CD79b+, CD11c+ muito forte, CD25+, CD103+ forte e cadeias leves *lambda*+. (figura 9)

Morfologia (esfregaço de um sangue periférico) – Presença de células de tamanho grande com citoplasma abundante, de contorno irregular com numerosas vilosidades citoplasmáticas. (figura 10)

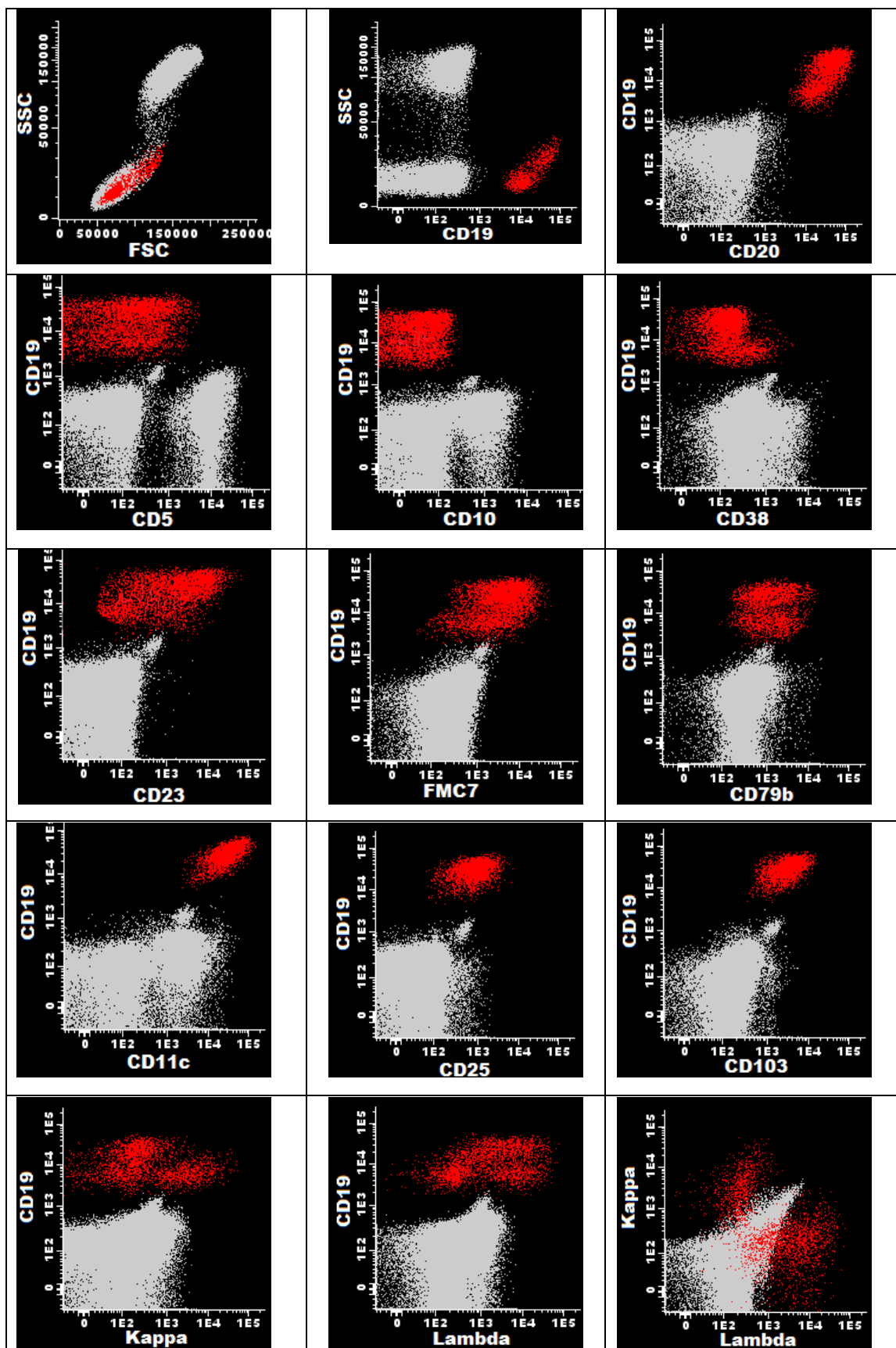


Figura 9 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com tricoleucemia (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

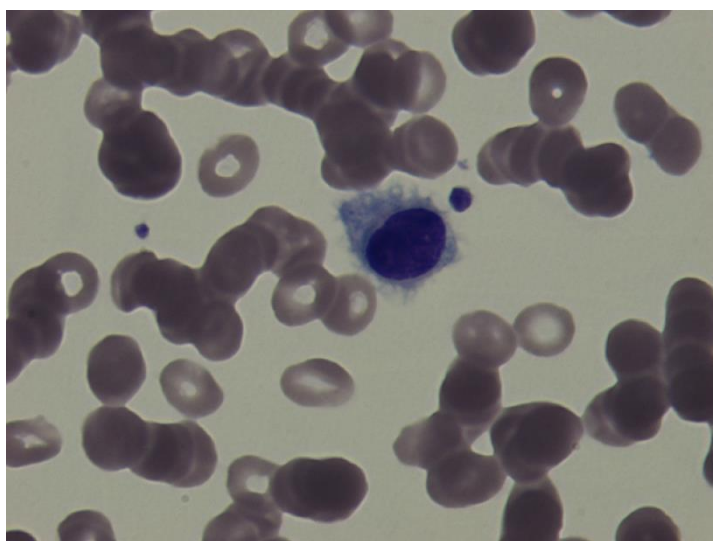


Figura 10 Esfregaço de sangue periférico de um doente com tricoleucemia (coloração de Leishman; 100x)

4.1.4 LINFOMA LINFOPLASMACÍTICO

4.1.4.1 Enquadramento teórico

Clínica: O linfoma linfoplasmacítico (LPL, *lymphoplasmacytic lymphoma*) é uma neoplasia de linfócitos B maduros, células linfoplasmocitárias e plasmócitos, que envolvem a medula óssea e por vezes os gânglios, o baço e o sangue periférico. É uma patologia rara, representando 1,5% dos linfomas. A idade média dos doentes é de 60 anos e a doença tem ligeiro predomínio nos homens. A maioria dos doentes apresenta fraqueza e fadiga relacionada com anemia. Alguns casos apresentam adenomegalias, esplenomegalia e hepatomegalia. Esta patologia está também associada à presença de IgM monoclonal no soro, o que pode aumentar a viscosidade sanguínea, dando origem à síndrome de hiperviscosidade com distúrbios visuais, problemas neurológicos, hemorragias e crioglobulinemia. Também podem ocorrer depósitos de IgM na pele ou no trato gastrointestinal, causando diarreias, e coagulopatias resultantes da ligação da IgM a fatores de coagulação.

Caraterísticas histopatológicas: As células neoplásicas formam um infiltrado difuso composto por linfócitos pequenos, alguns plasmócitos e células linfoplasmocitárias.

Caraterísticas morfológicas: Os linfócitos B neoplásicos, que são pequenos, têm núcleo redondo, cromatina condensada e citoplasma escasso, coexistem com um número variável de plasmócitos, que têm tamanho maior, forma oval, núcleo grande excêntrico e citoplasma basófilo, e de células linfoplasmocitárias, com forma intermédia entre linfócito e plasmócito. Também se observa frequentemente a presença de corpos de Dutcher (inclusão de imunoglobulinas no citoplasma).

Caraterísticas fenotípicas: As células B neoplásicas expressam CD19, CD20, CD22, CD79a e imunoglobulinas de membrana (IgM+). A expressão de CD25 e CD38 é variável. São negativas para CD5, CD10, CD23 e CD103 (excluindo B-CLL e HCL). Os plasmócitos expressam CD38 com intensidade forte, são CD138+ e CD20-, e acumulam cadeias μ de imunoglobulinas do citoplasma.

Caraterísticas genéticas: Não há alterações genéticas específicas associadas a esta patologia. No entanto, em mais de 50% dos casos, tem sido descrita a presença de del6q, associada a prognóstico desfavorável.

4.1.4.2 CASO 6. LINFOMA LINFOPLASMACÍTICO

Informação clínica – Homem, 51 anos. Gamapatia monoclonal em estudo.

Imunofenotipagem (aspirado medular) – Os linfócitos B representam 58% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+, CD20+, CD5-, CD10-, CD23-, CD38-, CD79b+, CD11c-, CD25+, CD103-, IgM+ e cadeias leves lambda+ (figura 11).

Morfologia (esfregaço de medula óssea) – Presença de linfócitos de tamanho médio, citoplasma ligeiramente basófilo e nucléolo impercetível (figura 12).

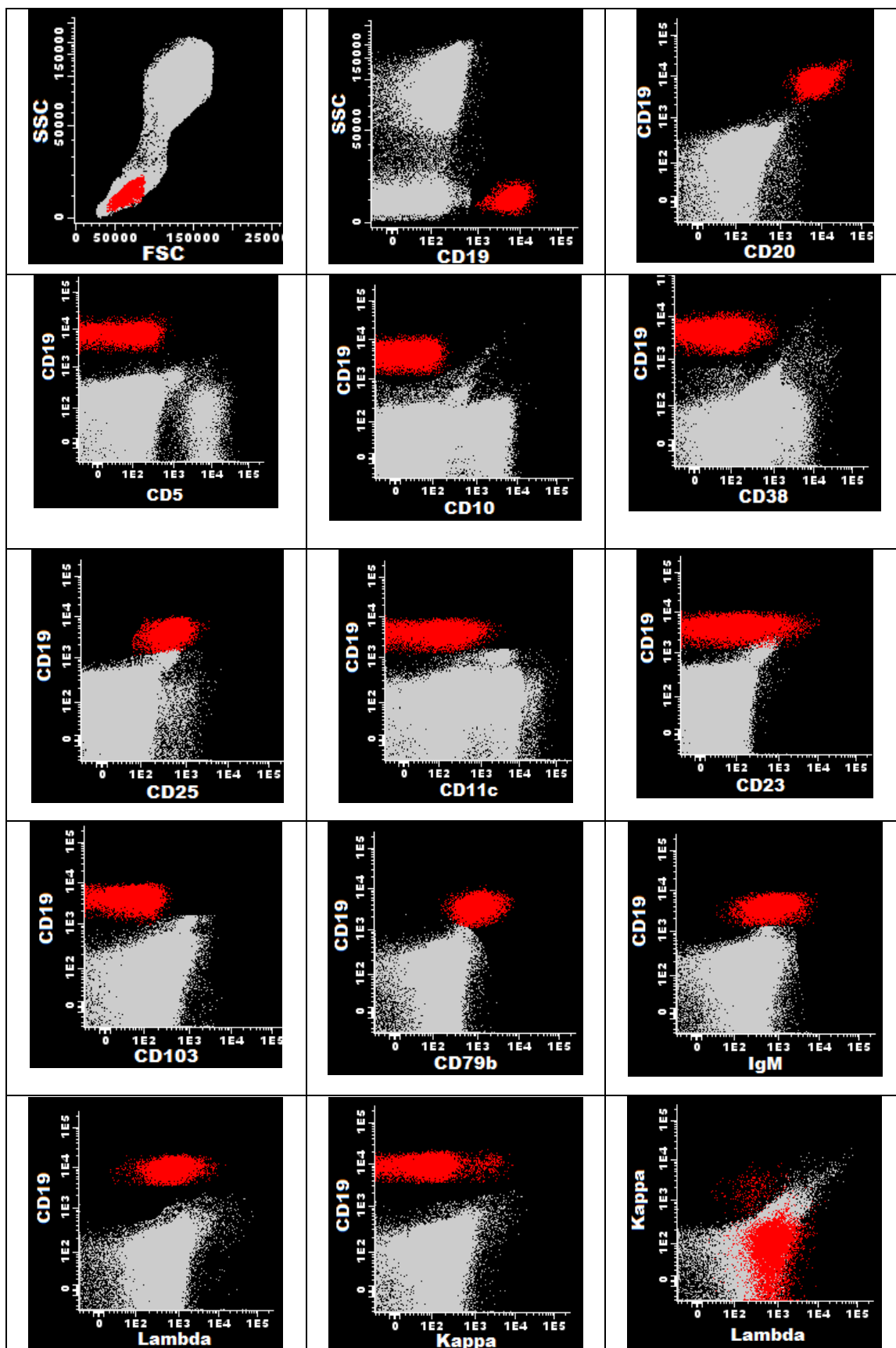


Figura 11 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de medula óssea de um doente com LPL (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

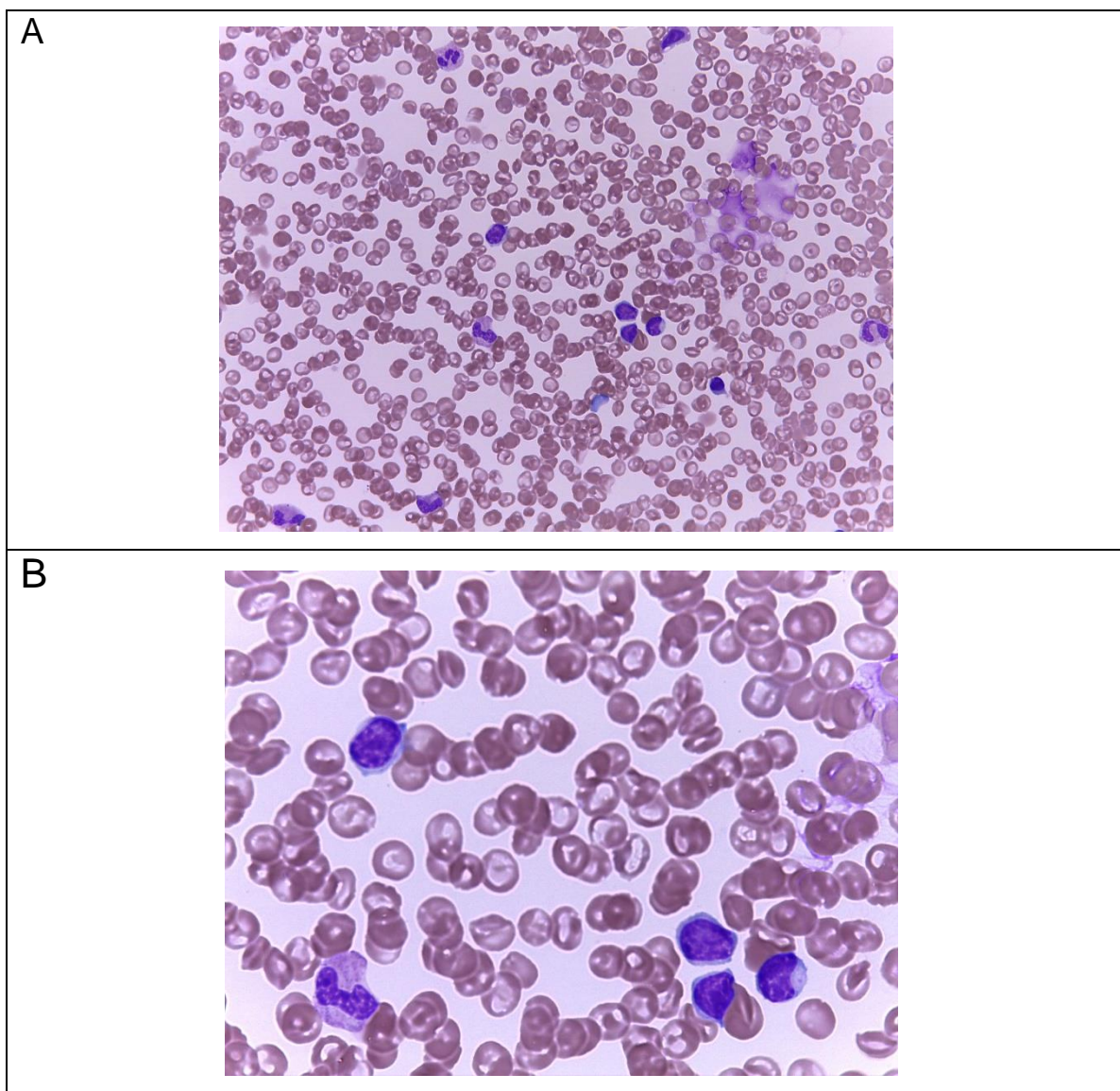


Figura 12 Esfregaço de medula óssea de um doente com linfoma linfoplasmacítico (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)

4.1.4.3 CASO 7. LINFOMA LINFOPLASMACÍTICO

Informação clínica – Homem, 78 anos. Anemia e gamapatia monoclonal IgM, *kappa* em análise de rotina. Adenopatias. Suspeita de linfoma ou mieloma múltiplo.

Imunofenotipagem (sangue periférico) – Os linfócitos B representam 70% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+, CD20+, CD10-, CD5-, CD23-, CD79b+ forte, CD11c-, CD25+ fraco, CD103-, CD38-, IgM+ forte e cadeias leves *kappa*+ forte (figura 13).

Morfologia (esfregaço de sangue periférico) – Presença de linfócitos de tamanho médio a grande, com citoplasma relativamente abundante e moderadamente basófilo; núcleo de contorno irregular, nucléolo visível mas pouco perceptível (figura 14).

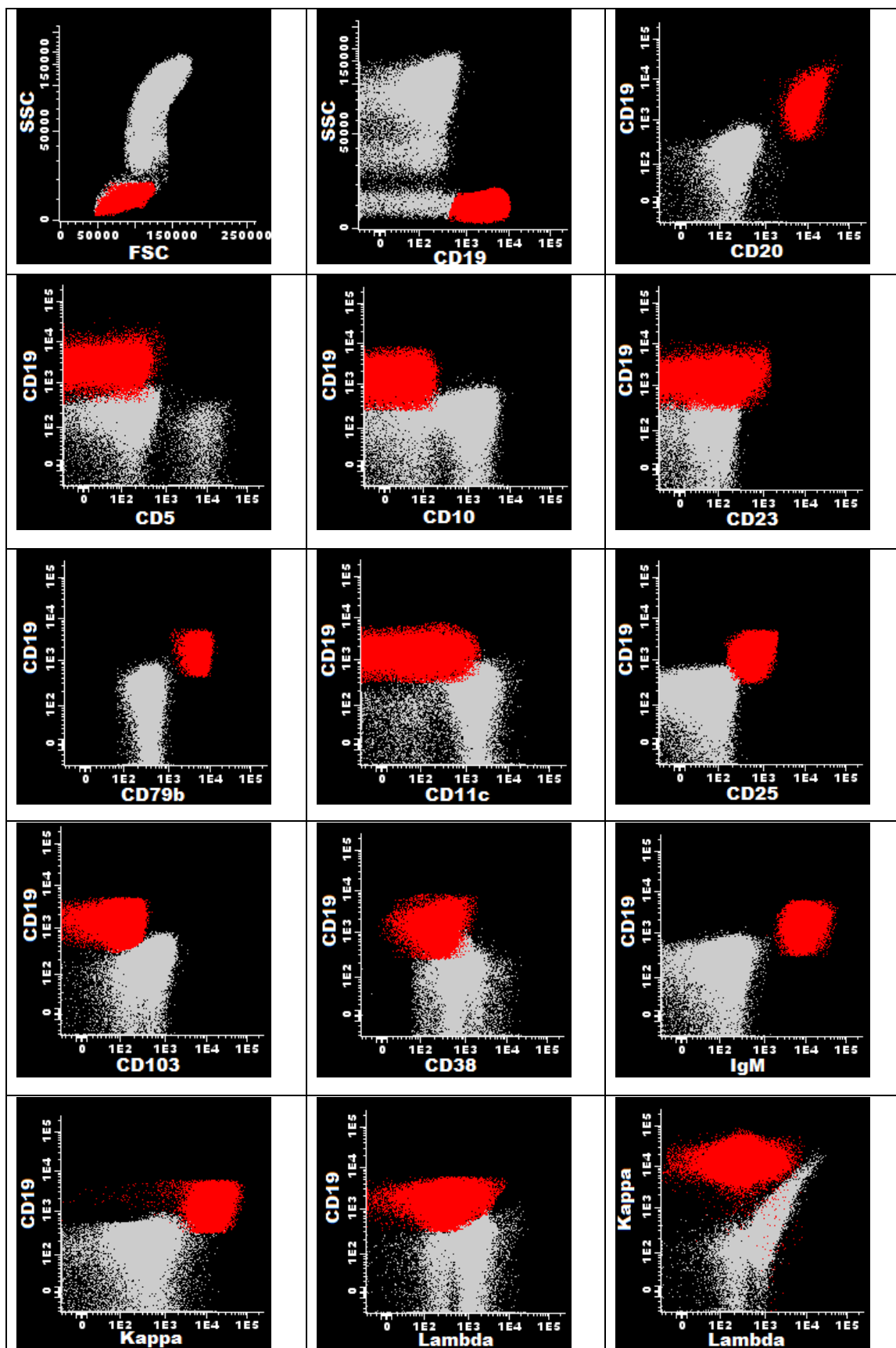


Figura 13 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com LPL (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

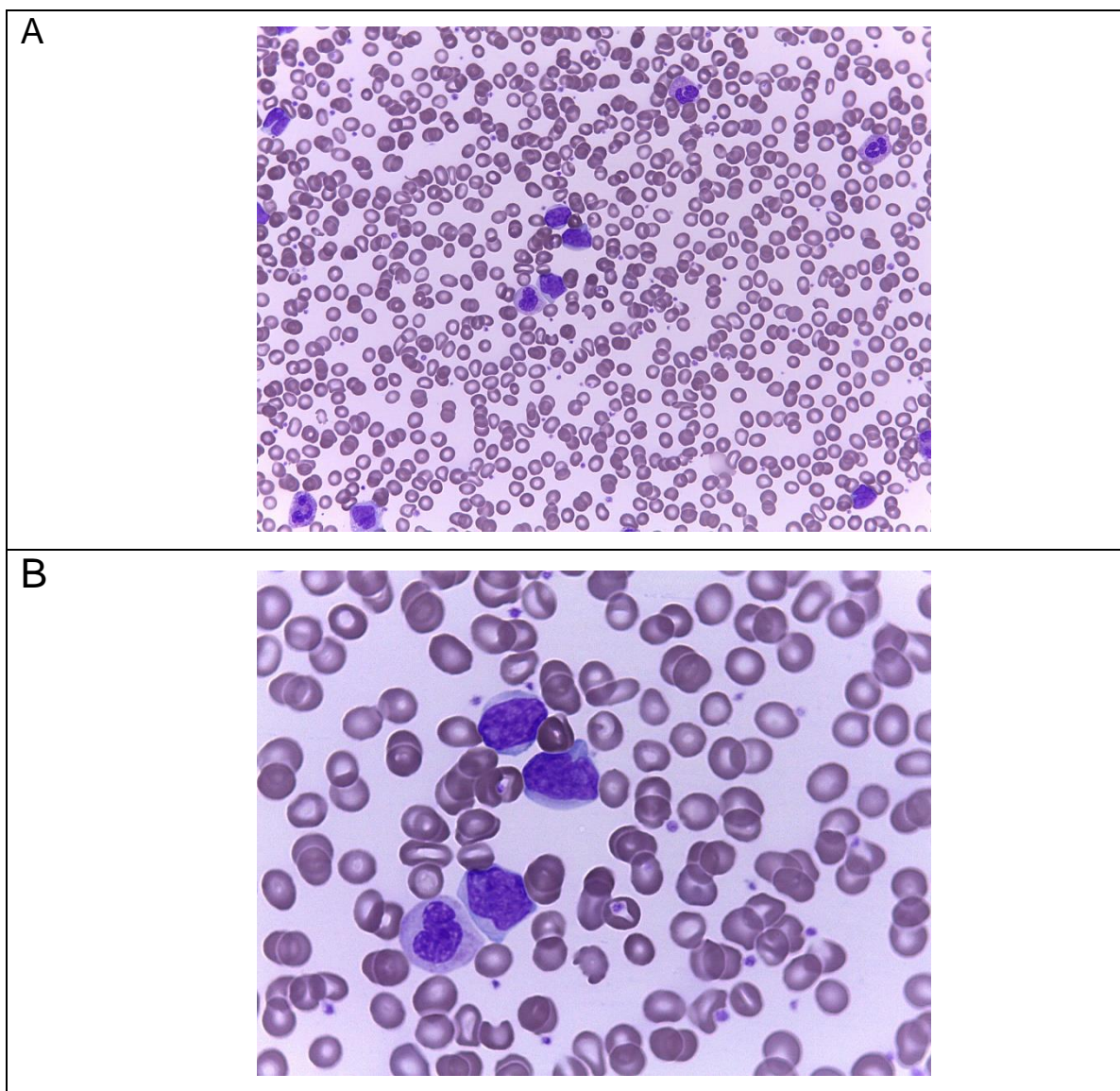


Figura 14 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfoma linfoplasmacítico (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)

4.1.5 LINFOMA FOLICULAR

4.1.5.1 Enquadramento teórico

Clínica: O linfoma folicular (FL, *follicular lymphoma*) é uma neoplasia com origem nos linfócitos do centro germinativo dos folículos linfóides, que envolve predominantemente gânglios linfáticos, podendo também envolver o baço, a medula óssea e o sangue periférico. Representa 20% de todos os linfomas com grande incidência nos Estados Unidos da América e Europa Ocidental. A doença afeta tanto homens como mulheres e a idade média ao diagnóstico é de 60 anos.

Caraterísticas histopatológicas: A maior parte dos casos o linfoma têm um padrão de crescimento folicular. Os folículos neoplásicos são geralmente pouco definidos e sem zonas de manto.

Caraterísticas morfológicas: As células neoplásicas típicas são os centrócitos (pequenos linfócitos com cromatina densa, fenda nuclear e citoplasma escasso) e os centroblastos (linfócitos grandes com núcleo redondo ou oval, cromatina vesicular, nucléolos periféricos e citoplasma basófilo). A percentagem destas células é extremamente variável, sendo que os centrócitos são as células predominantes, mas os centroblastos estão sempre presentes.

Caraterísticas fenotípicas: As células neoplásicas expressam CD19 (fraco), CD20, CD22 e imunoglobulinas de membrana (IgM em 60% e IgG em 40% dos casos). Carateristicamente expressam CD10, FMC7, bcl2 e bcl6, e são negativas para CD5 e CD43.

Características genéticas: A alteração genética tipicamente associada ao linfoma folicular é a t (14;18), que ocorre em cerca de 90% dos casos. Existem outras alterações comuns, sendo que algumas têm valor de prognóstico: sem valor de prognóstico: del10q, ganhos 1, 6p, 7, 8 e 18q; com prognóstico desfavorável: del6q, del17p, del1p, ganhos 12, 18p e Xp; raros casos com t (14;18) e t (8;14).

4.1.5.2 CASO 8. LINFOMA FOLICULAR

Informação clínica – Mulher, 66 anos. Sem informação clínica disponível.

Imunofenotipagem (sangue periférico) – Os linfócitos B representam 52% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+ fraco, CD20+, CD5-, CD10+, CD38+, cadeias leves *kappa*+ e expressão aumentada de bcl2 (figura 15).

Morfologia (esfregaço de sangue periférico) – Presença de pequenos linfócitos com cromatina densa e citoplasma escasso (figura 16).

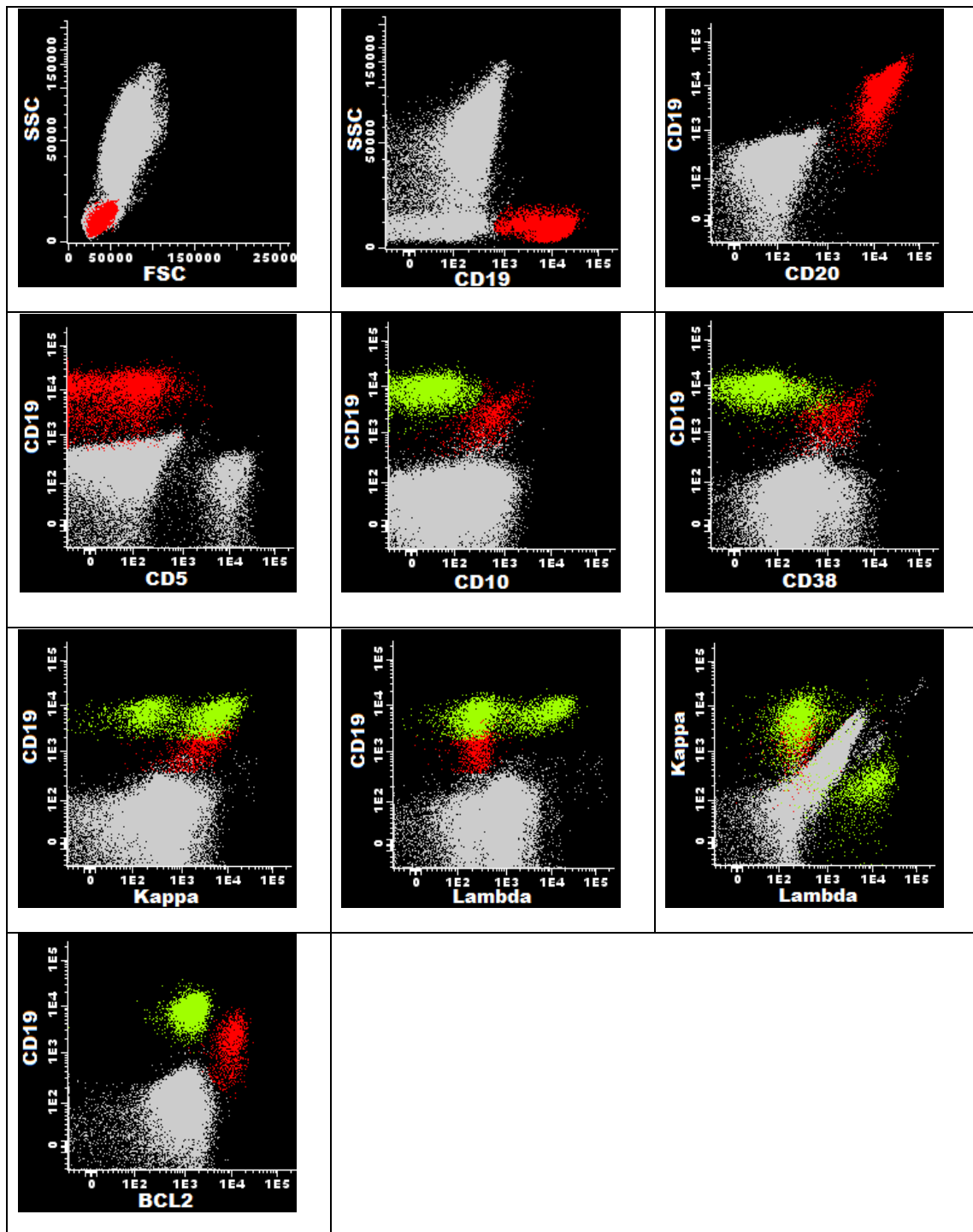


Figura 15 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com linfoma folicular (■ linfócitos B neoplásicos; ■ linfócitos B normais; ■ restantes leucócitos)

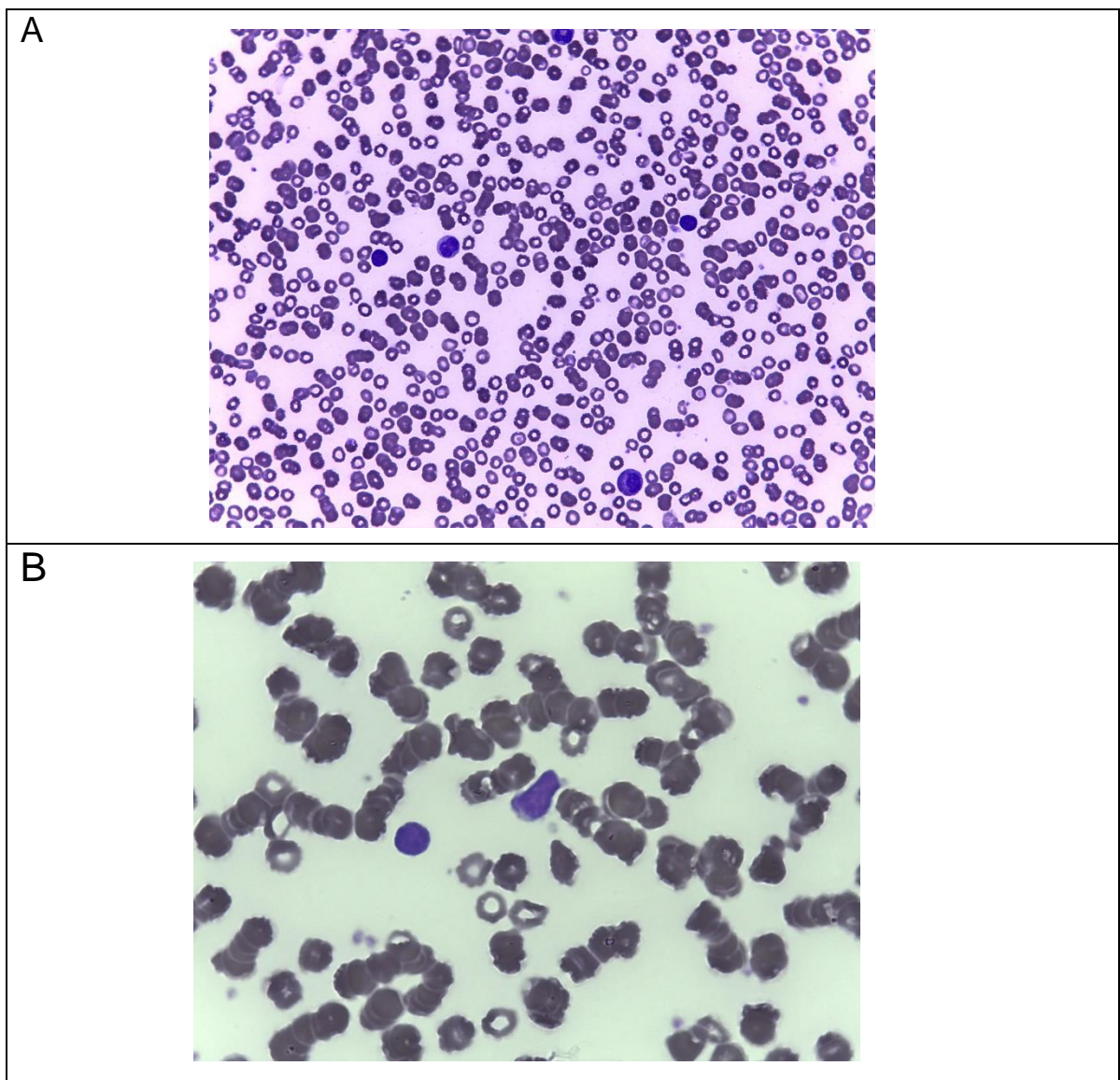


Figura 16 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfoma folicular (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)

4.1.5.3 CASO 9. LINFOMA FOLICULAR

Informação clínica – Homem, 39 anos, adenopatias, sintomas B

Imunofenotipagem (sangue periférico) – Os linfócitos B representam 57% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+ fraco, CD20+, CD5-, CD10+, CD38+ fraco, FMC7+, cadeias leves *lambda*+ e expressão aumentada de bcl2. (figura 17)

Morfologia (esfregaço de sangue periférico) – Presença de centrócitos, pequenos linfócitos com cromatina densa, fenda nuclear e citoplasma escasso. (figura 18)

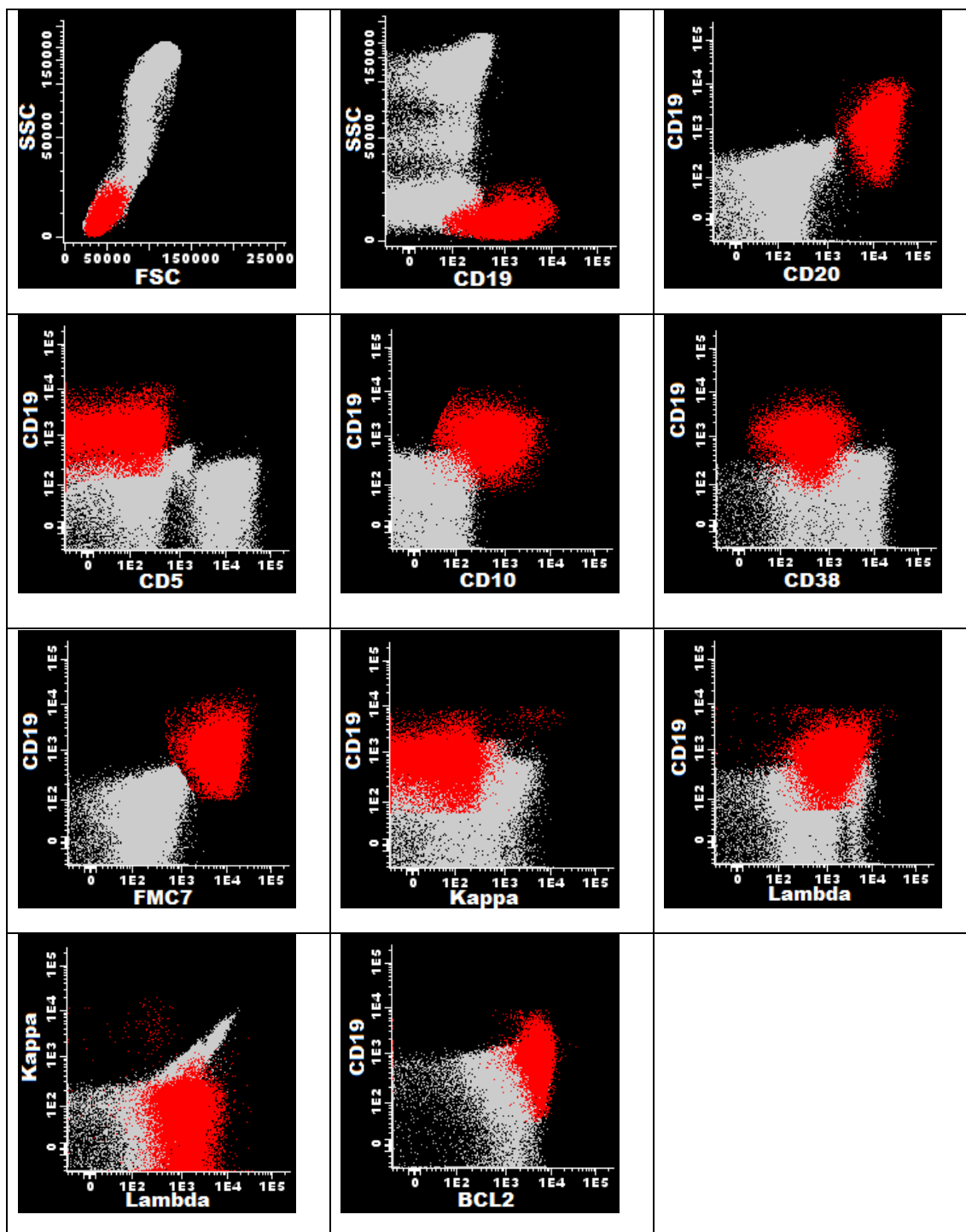


Figura 17 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com linfoma folicular (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

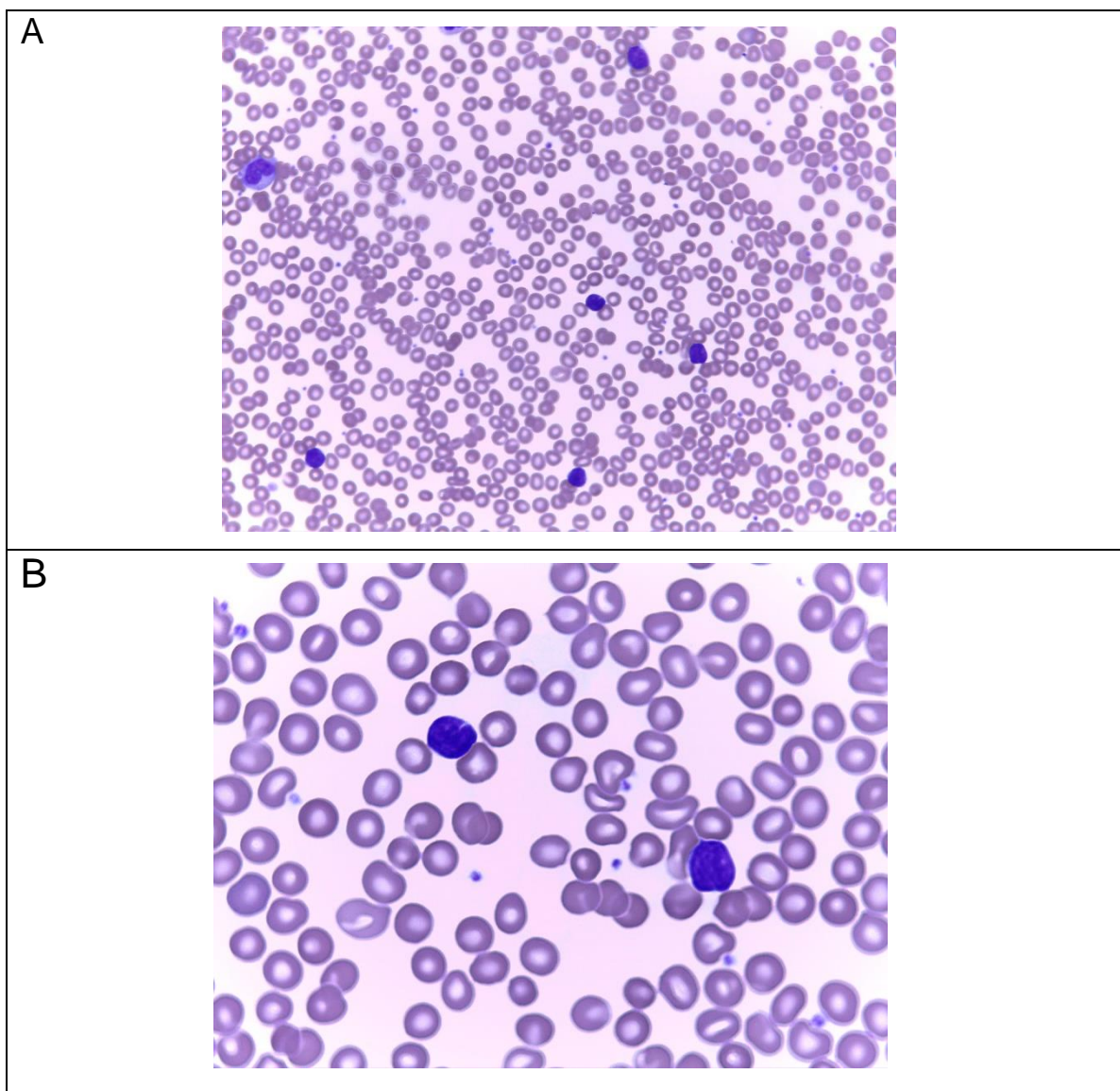


Figura 18 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfoma folicular (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)

4.1.6 LINFOMA DO MANTO

4.1.6.1 Enquadramento teórico

Clínica: O linfoma de células do manto (MCL, *mantle cell lymphoma*) é uma neoplasia com origem nos linfócitos B do manto dos folículos linfóides que envolve essencialmente os gânglios linfáticos, podendo também envolver o baço, a medula óssea e o sangue periférico. Outros sítios frequentes de envolvimento são o trato gastrointestinal e o anel Waldeyer. É uma patologia rara representando 3-10% dos linfomas não-Hodgkin. A idade média ao diagnóstico é de 60 anos e os homens são mais afetados do que as mulheres (2:1). A maior parte dos doentes apresenta adenopatias acompanhadas por hepatoesplenomegalia. É comum existir leucocitose com linfocitose.

Caraterísticas histopatológicas: O proliferação linfóide tem origem na zona do manto, podendo o padrão de crescimento ser difuso ou nodular.

Caraterísticas morfológicas: As células neoplásicas são linfócitos de tamanho pequeno a médio, com núcleo irregular, cromatina ligeiramente dispersa e nucléolo impercetível. Podem estar presentes histiócitos (macrófagos inativos, com os pseudópodes retraídos e aspeto ovoide).

Caraterísticas fenotípicas: As células neoplásicas expressam CD19, CD20, CD22 e imunoglobulinas de membrana com intensidade forte (IgM /IgD), sendo a restrição de cadeia leve lambda mais frequente do que kappa. Carateristicamente expressam CD5, CD43, FMC7, ciclina D1 e bcl2. O CD23 é positivo fraco ou negativo. O SOX11 tem sido utilizado como marcador específico nos casos raros em que ciclina D1 é negativo. As células são negativas para CD10 e bcl6.

Caraterísticas genéticas: A alteração genética presente em quase todos os casos de linfoma do manto é a t (11;14). No entanto, podem existir outras alterações genéticas associadas, com ou sem valor de prognóstico: sem valor de prognóstico: ganho 7p21 (16-34% dos casos), ganho 8q24 (16-36% dos casos), del1p13-p31 (29-52% dos casos), del6q23-q27 (23-38% dos casos), del11q22-q23 (21-59% dos casos), del13q11-q13 (22-55% dos casos), del13q14-q34 (43-51% dos casos), del17p13-pter (43-51% dos casos); com prognóstico desfavorável: ganho 3q26 (31-50% dos casos), del9p21 (18-31% dos casos), trissomia 12 (25% dos casos); raros casos com t (8;14) (MYC).

4.1.6.2 CASO 10. LINFOMA DO MANTO

Informação clínica – Mulher, 67 anos. Adenopatias.

Imunofenotipagem (aspirado medular) – Os linfócitos B representam 61% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+, CD20+, CD5+, CD10-, CD38+, CD23 variável, FMC7+, CD79b+ e cadeias leves *lambda*+ (figura 19).

Morfologia (esfregaço de medula óssea) – Presença de linfócitos pequenos, cromatina ligeiramente dispersa e nucléolo impercetível (figura 20).

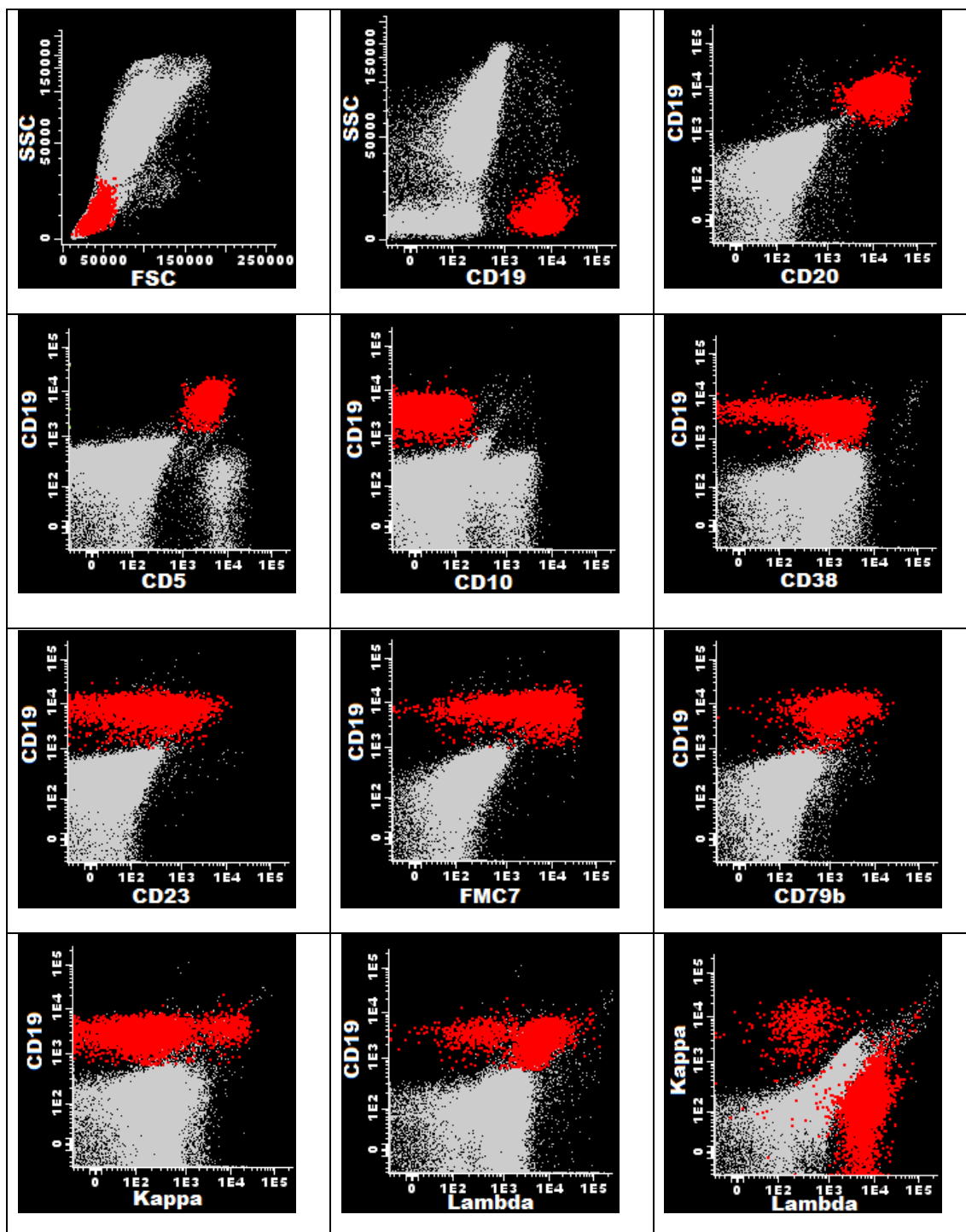


Figura 19 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de medula óssea de um doente com linfoma do manto (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

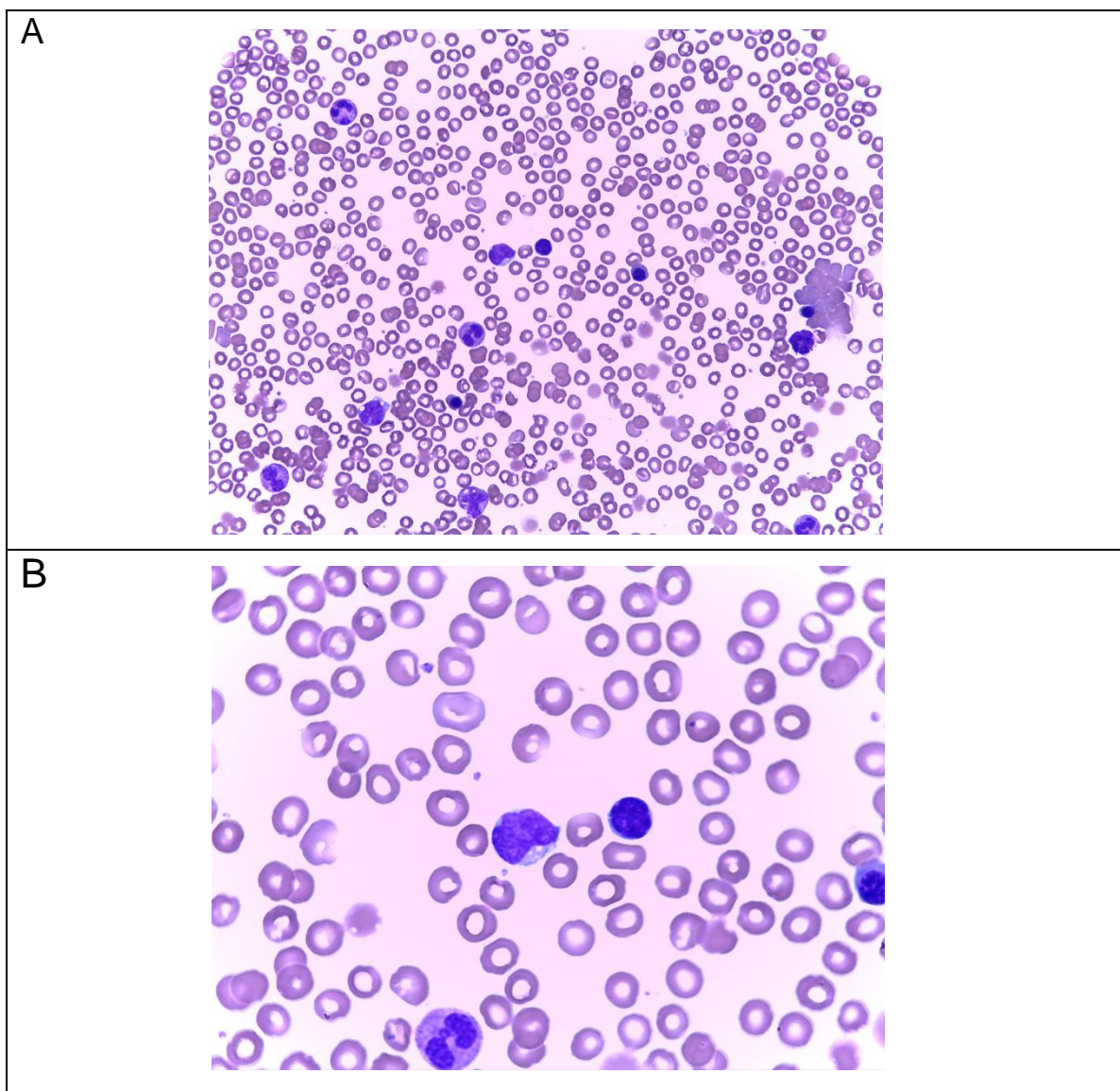


Figura 20 Esfregaço de medula óssea de um doente com linfoma do manto (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)

4.1.6.3 CASO 11. LINFOMA DO MANTO

Informação clínica – Mulher, 87 anos. Suspeita de leucemia aguda / linfoma leucemizado.

Imunofenotipagem (sangue periférico) – Os linfócitos B representam 63% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+, CD20+ forte, CD5+, CD10-, CD38+, CD23-, FMC7+, CD79b+, IgD+, IgM+ e cadeias leves *kappa*+ (figura 21).

Morfologia (esfregaço de sangue periférico) – Presença de linfócitos de tamanho médio com núcleo irregular, cromatina dispersa e nucléolo impercetível (figura 22).

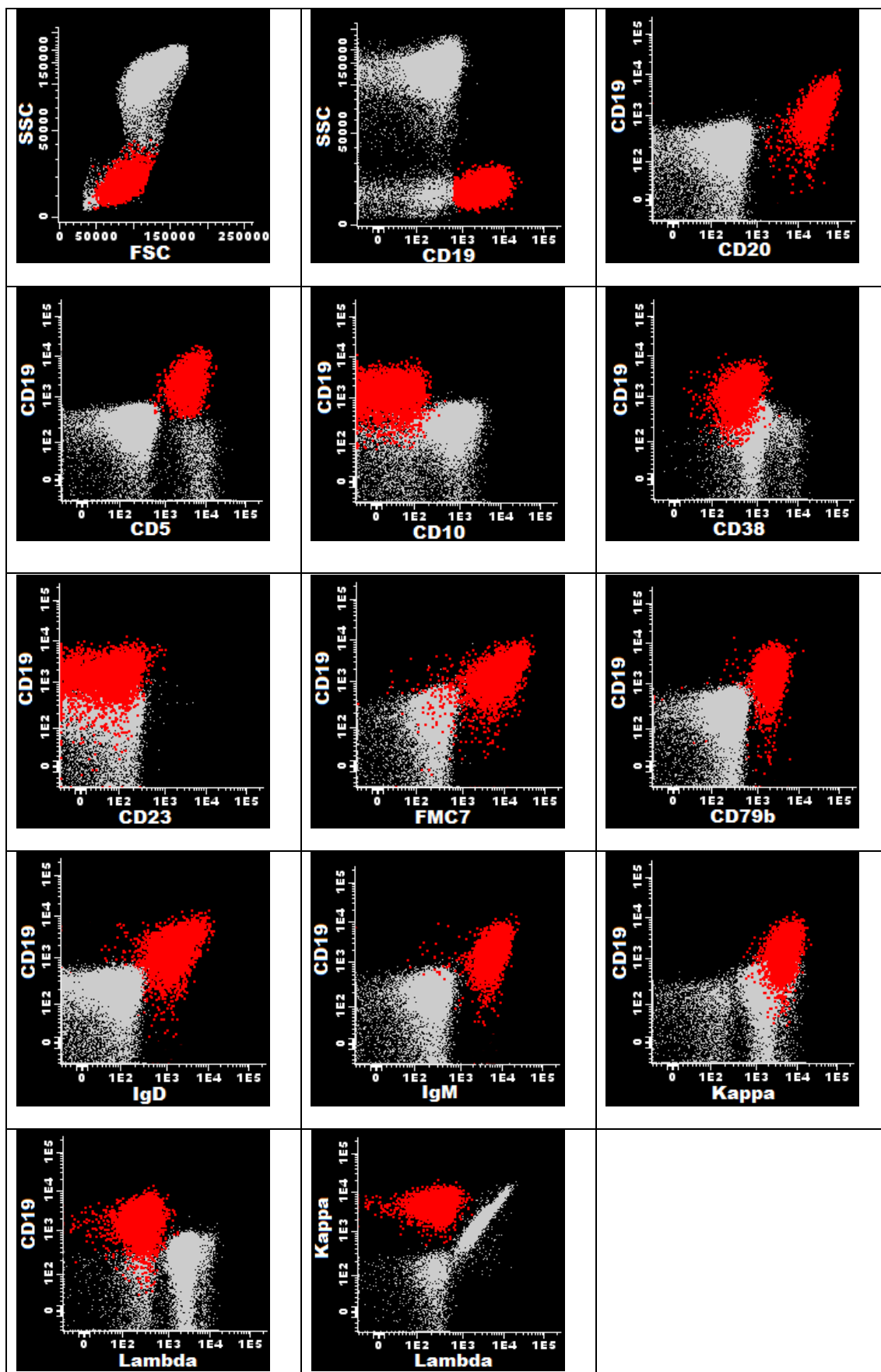


Figura 21 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com linfoma do manto (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

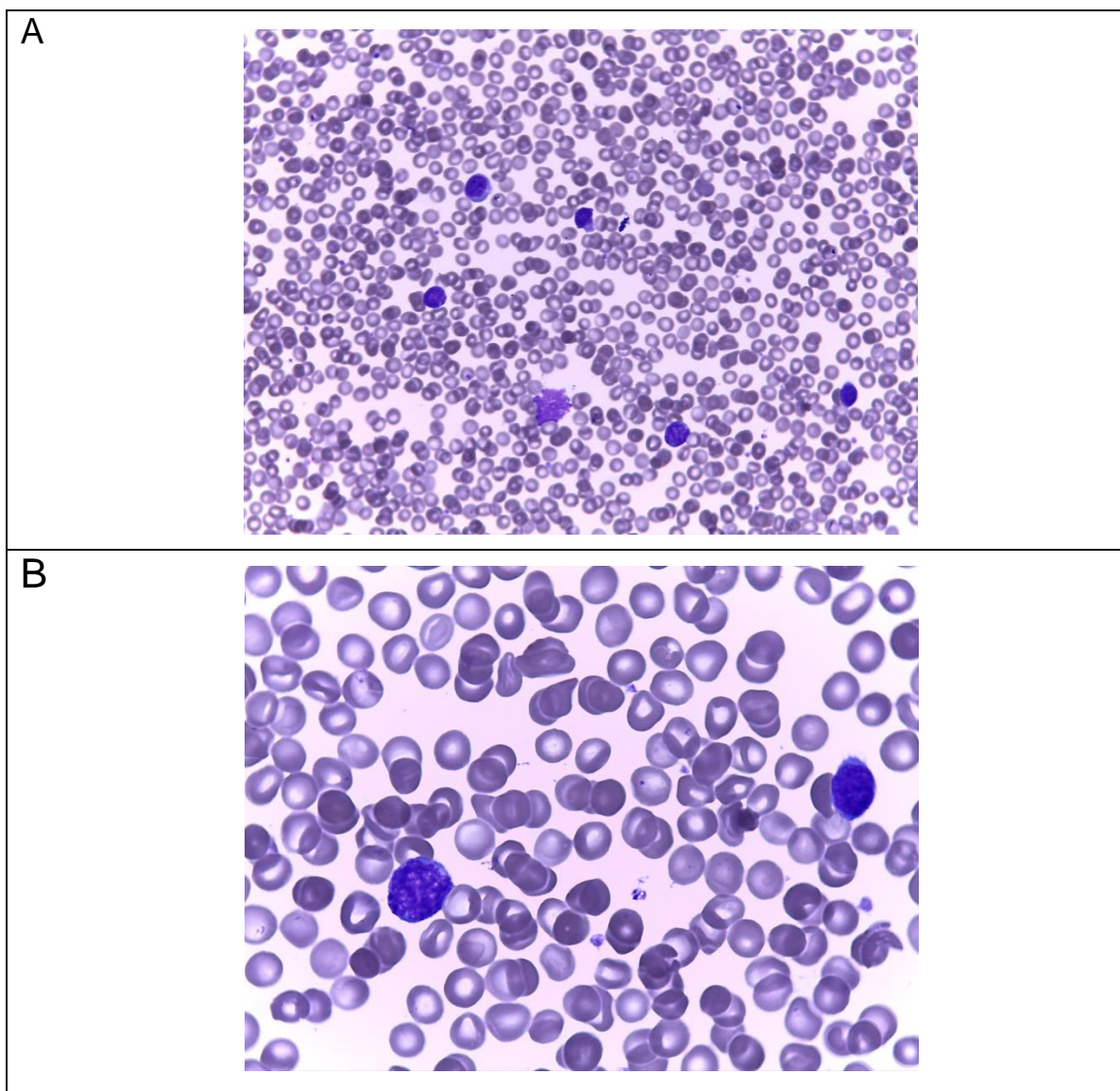


Figura 22 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfoma do manto (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)

4.1.7 LINFOCITOSE PERSISTENTE POLICLONAL DE LINFÓCITOS B BINUCLEADOS

4.1.7.1 Enquadramento teórico

Clínica: A linfocitose persistente policlonal de linfócitos B binucleados é uma doença linfoproliferativa de células B rara que envolve baço, medula óssea e sangue periférico. Tem maior predominância em mulheres jovens adultas (pico de incidência nos 40 anos) fumadoras. Caracteriza-se por uma linfocitose persistente e níveis elevados de IgM no soro. A maior parte dos doentes apresenta sinais e sintomas não específicos como fraqueza e fadiga. Uma pequena percentagem dos casos cursa com esplenomegalia ligeira.

Caraterísticas histopatológicas: No baço existe expansão dos nódulos da polpa branca, à custa de linfócitos pequenos. Também é observada infiltração massiva da polpa vermelha por linfócitos com as mesmas caraterísticas, que se localizam nos cordões esplénicos e dentro dos sinusóides, onde ocasionalmente podem ser observados linfócitos binucleados.

Caraterísticas morfológicas: É característica a presença, no sangue periférico e em número variável, de linfócitos grandes, "binucleados" com citoplasma basófilo abundante.

Caraterísticas fenotípicas: As células neoplásicas expressam CD19, CD20, CD22, CD79b, FMC7, imunoglobulinas de membrana (IgM e IgD) e cadeias leves kappa ou lambda. Também expressam CD18, CD25, CD27 e bcl2 e são negativas para CD5, CD10, CD23, CD31, CD38, CD43 e ciclina D1.

Caraterísticas genéticas: Foi descrita a anomalia +i (3q) em 70% dos casos. Alguns casos cursam com trissomia 3.

4.1.7.2 CASO 12. LINFOCITOSE PERSISTENTE POLICLONAL DE LINFÓCITOS B BINUCLEADOS

Informação clínica – Mulher, 48 anos. Linfocitose B policlonal em estudo.

Imunofenotipagem (aspirado medular) – Os linfócitos B representam 71% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+, CD20+, CD5-, CD10-, CD38-, CD27+, IgM+ e razão de cadeias leves *kappa/lambda* normal (figura 23).

Morfologia (esfregaço de medula óssea) – Presença de linfócitos grandes, “binucleados” com citoplasma abundante (figura 24).

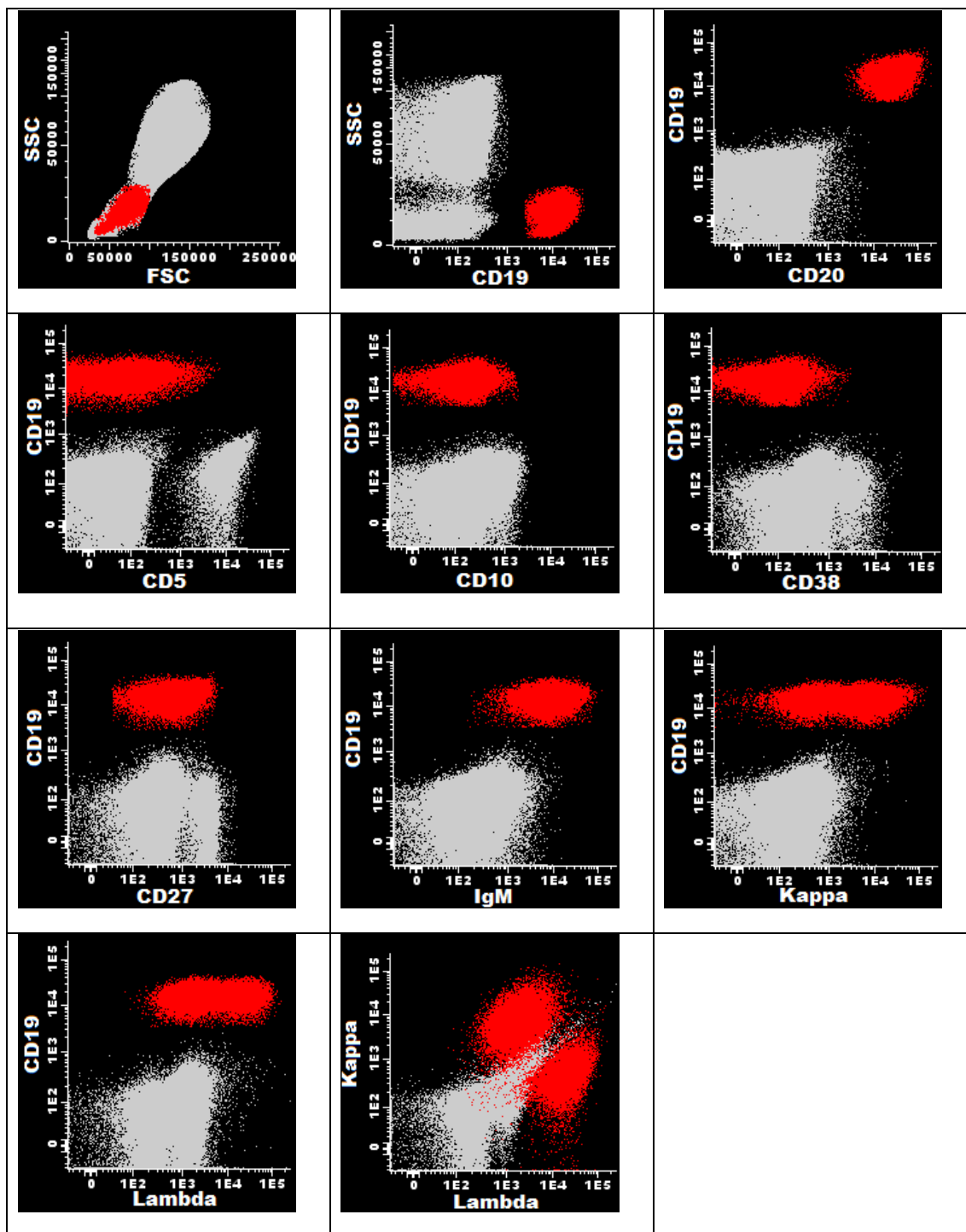


Figura 23 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de medula óssea de um doente com linfocitose persistente policlonal de linfócitos B binucleados (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

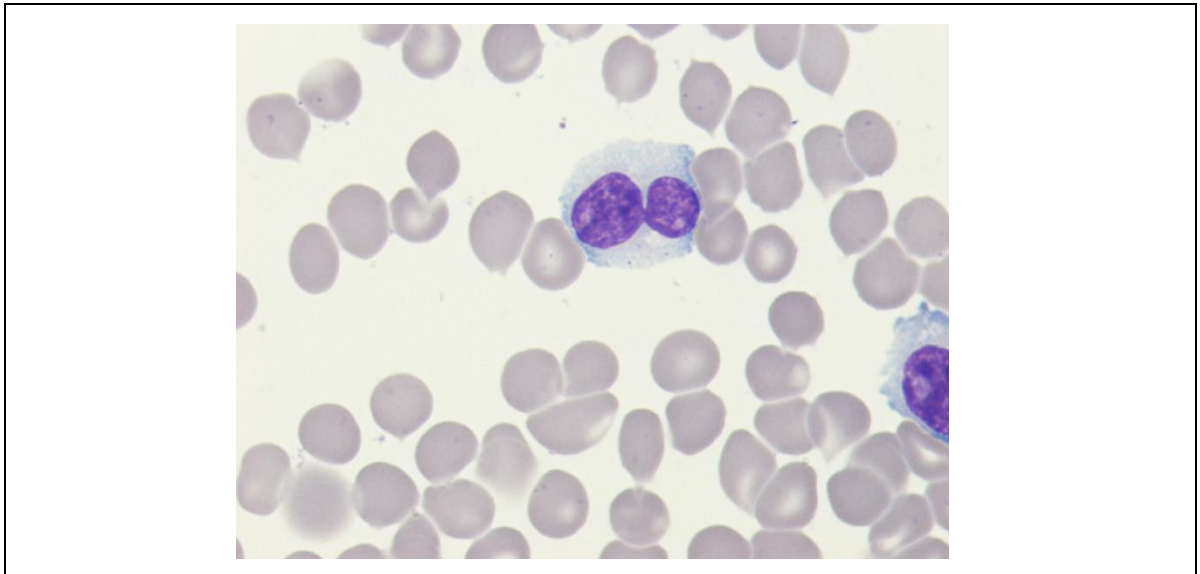


Figura 24 Esfregaço de medula óssea de um doente com linfocitose persistente policlonal de linfócitos B binucleados (coloração de Leishman; 100x)

4.1.7.3 CASO 13. LINFOCITOSE PERSISTENTE POLICLONAL DE LINFÓCITOS B BINUCLEADOS

Informação clínica – Mulher, 28 anos. Linfocitose

Imunofenotipagem (sangue periférico) – Os linfócitos B representam 48% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+, CD20+, CD10-, CD5 variável, CD27+, IgM+, IgD+ e razão de cadeias leves *kappa/lambda* normal (figura 25).

Morfologia (esfregaço de sangue periférico) – Presença de linfócitos grandes, “binucleados” com citoplasma abundante (figura 26).

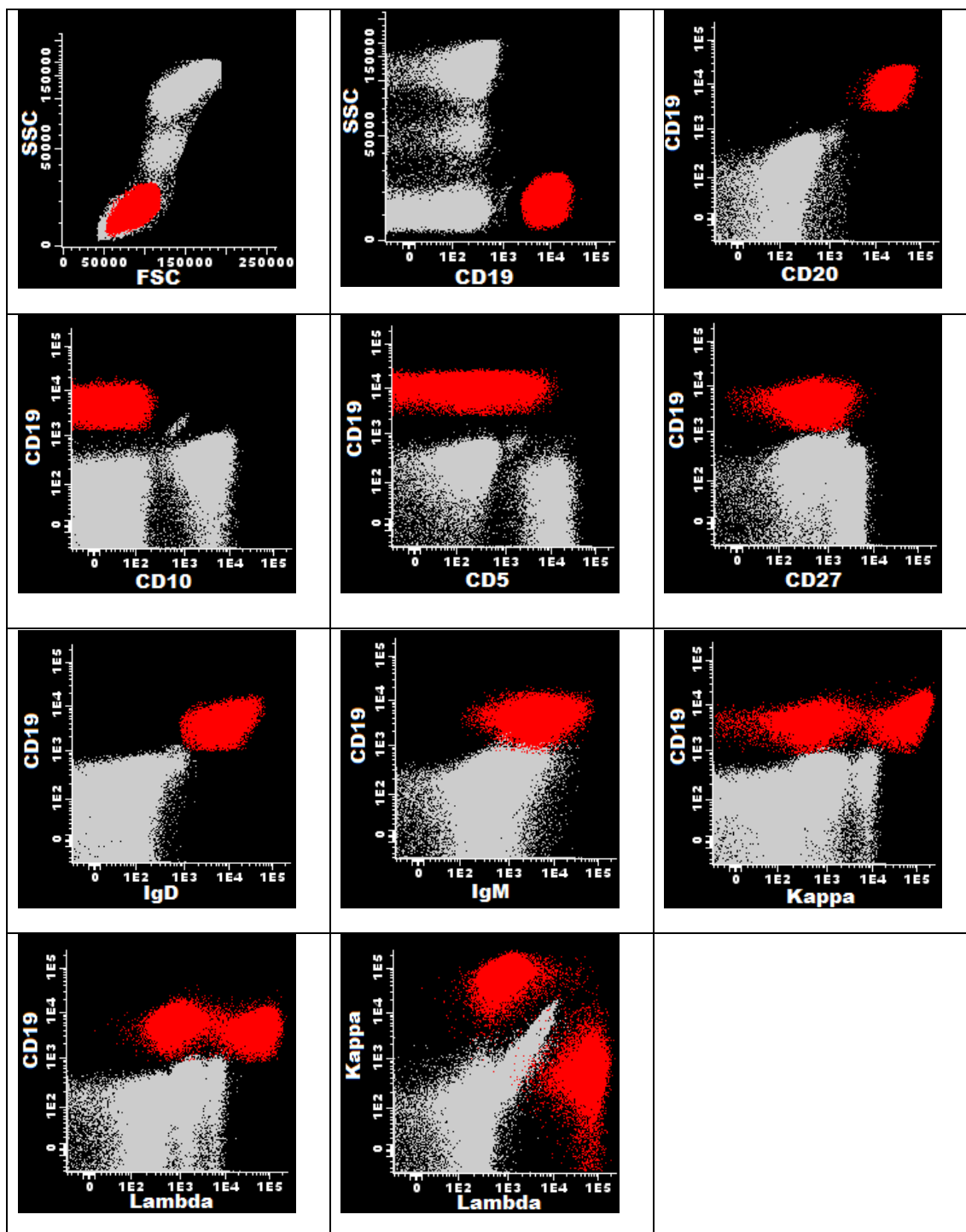


Figura 25 Dotplots representativos da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico de um doente com linfocitose persistente policlonal de linfócitos B binucleados (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

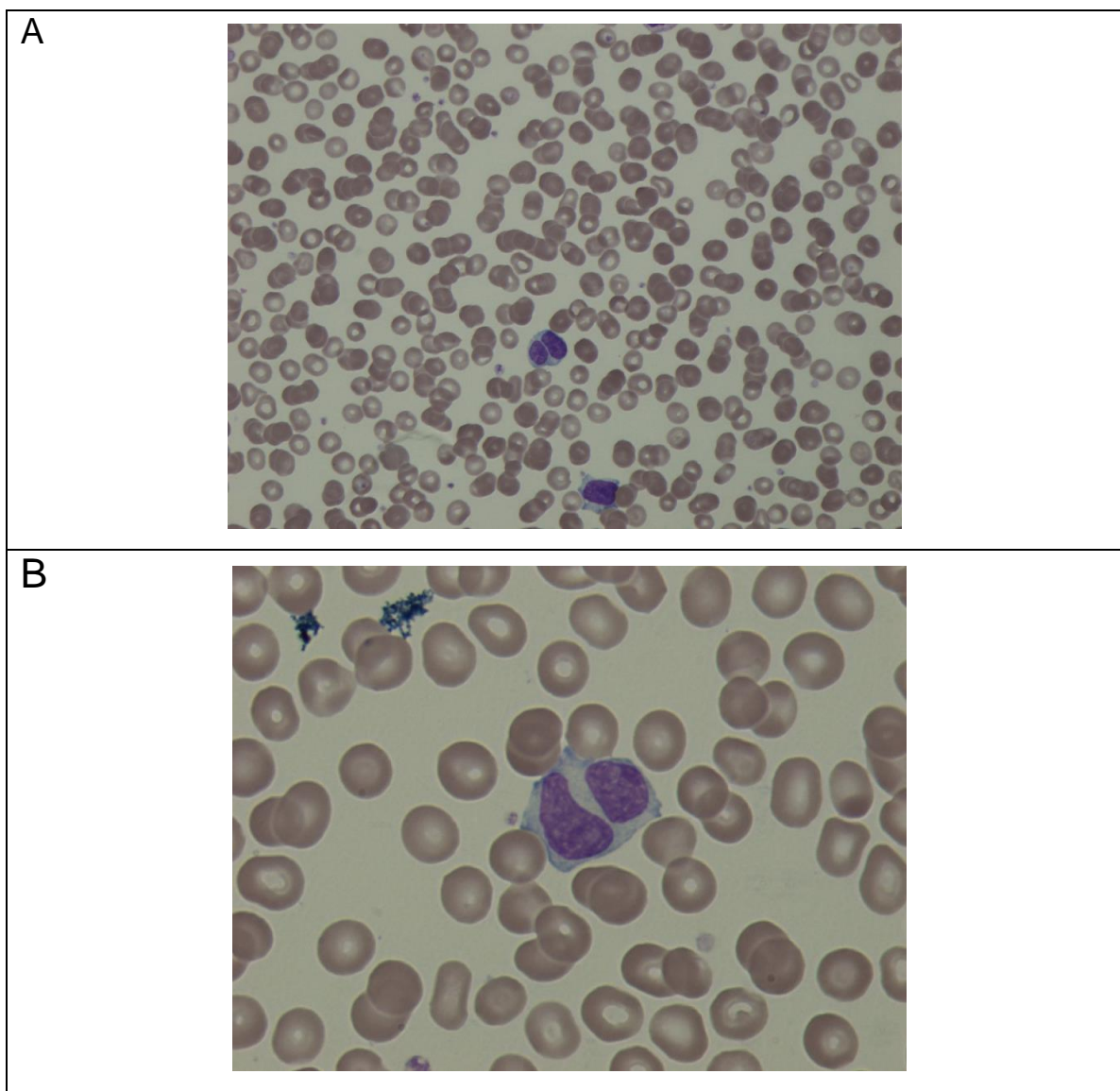


Figura 26 Esfregaço de sangue periférico de um doente com linfocitose persistente policlonal de linfócitos B binucleados (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)

4.1.8 LINFOMA DE BURKITT

4.1.8.1 Enquadramento teórico

Clínica: O linfoma de Burkitt (BL, *Burkitt lymphoma*) é uma neoplasia de linfócitos B com origem no centro germinativo e curto tempo de duplicação, do qual se conhecem 3 variantes: a) BL endêmico: ocorre na África Equatorial, com um pico de incidência dos 4 aos 7 anos e uma razão homem: mulher de 2:1; cursa com tumor ósseo ou facial em 50% dos casos, mas também pode afetar outros locais como mesentério, ovários, testículos, rim, mama e meninges; b) BL esporádico: ocorre por todo o mundo, principalmente em crianças e adultos jovens; a incidência é baixa representando apenas 1-2% dos linfomas da Europa Ocidental e Estados Unidos da América; a idade média dos doentes adultos é 30 anos; a razão homem: mulher é de 2 ou 3:1, e em crianças esta razão é ainda mais acentuada; pode envolver vários órgãos como o tubo digestivo (intestino delgado, estômago, cego), mesentério, rim, testículos, ovários e mama; alguns casos têm envolvimento dos ossos da face (25%), e também da medula óssea e do sistema nervoso central (30 e 15% dos casos); os sinais e sintomas podem incluir obstrução intestinal ou hemorragia gastrointestinal; c) BL associado a imunodeficiência: é encontrado em associação com a infeção pelo VIH; apresentação ganglionar é frequente, assim como envolvimento da medula óssea.

Caraterísticas morfológicas: As células neoplásicas típicas são de tamanho médio com núcleo redondo, nucléolos múltiplos e citoplasma basófilo que geralmente contém vacúolos lipídicos. Em alguns casos têm basófilo e núcleo excêntrico com um único nucléolo central (BL com diferenciação plasmacitóide) e outros apresentam grande pleomorfismo celular (BL atípico).

Caraterísticas fenotípicas: As células neoplásicas expressam CD19, CD20, CD22, CD79a e imunoglobulinas de membrana (IgM) com restrição de cadeias leves (mais kappa do que lambda), assim como CD10, CD38, CD43, CD77 e bcl6. O bcl2 é positivo fraco ou negativo. Não há expressão de CD5, CD23, CD34 e TdT.

Caraterísticas genéticas: É típica a existência de translocação entre o braço longo do cromossoma 8 (oncogene MYC), e os genes que codificam para as cadeias pesadas (IGH) e leves (IGK e IGL) das imunoglobulinas: gene IGH no cromossoma 14 (80% os casos) – t (8;14); gene IGK no cromossoma 2 (15% dos casos) – t (2;8) – gene da IGL no cromossoma 22 (5% dos casos) – t (8;22).

4.1.8.2 CASO 14. LINFOMA DE BURKITT

Informação clínica – Mulher, 40 anos. Informação clínica não disponível.

Imunofenotipagem (aspirado medular) – Os linfócitos B representam 76% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+, CD20+, CD5-, CD10+, CD38+, CD34-, TdT-, cadeias leves *lambda*+ e expressão diminuída de bcl2 (figura 27).

Morfologia (esfregaço de medula óssea) – Presença de células de tamanho médio com citoplasma basófilo contendo vacúolos lipídicos (figura 28).

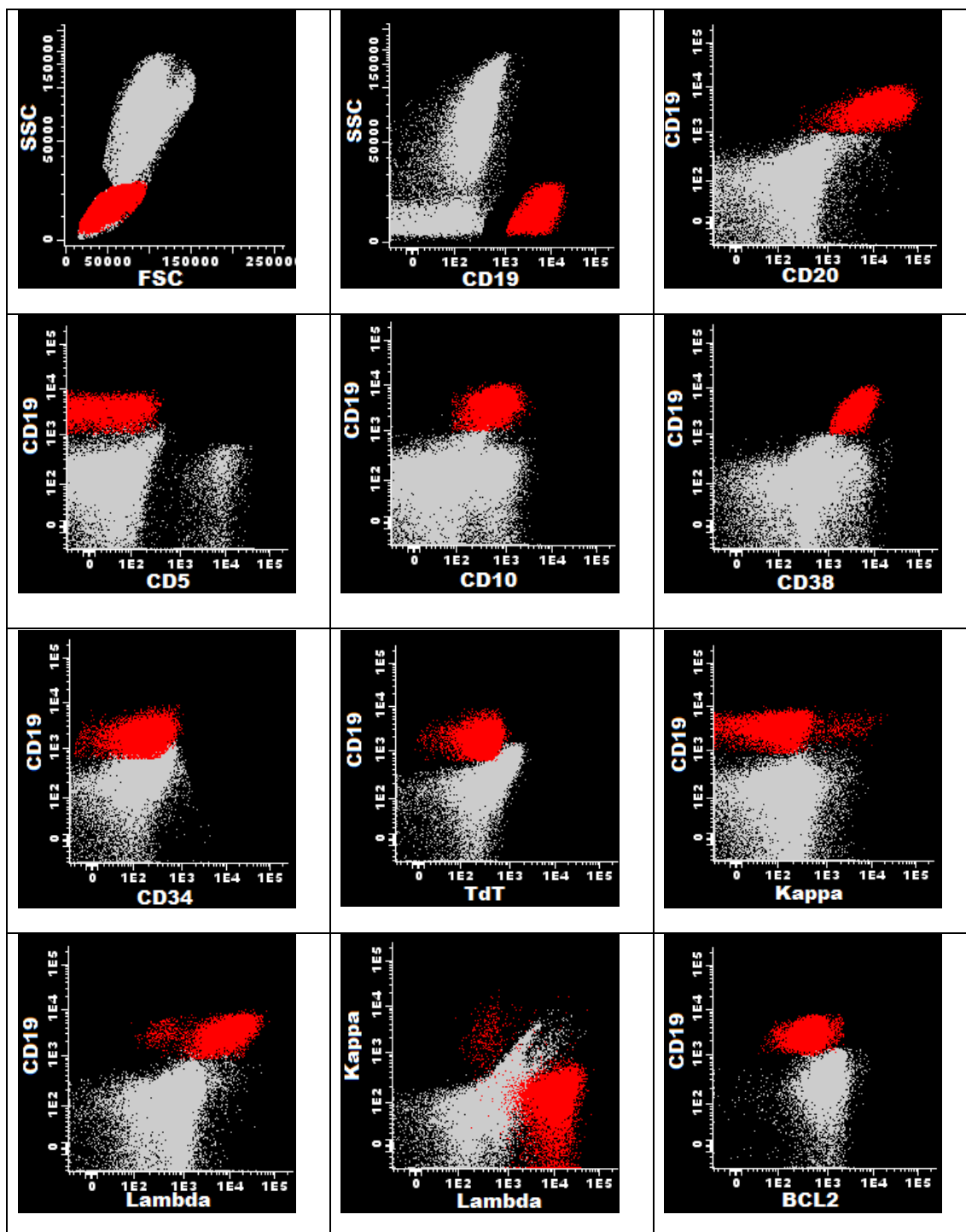


Figura 27 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de medula óssea de um doente com linfoma de Burkitt (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

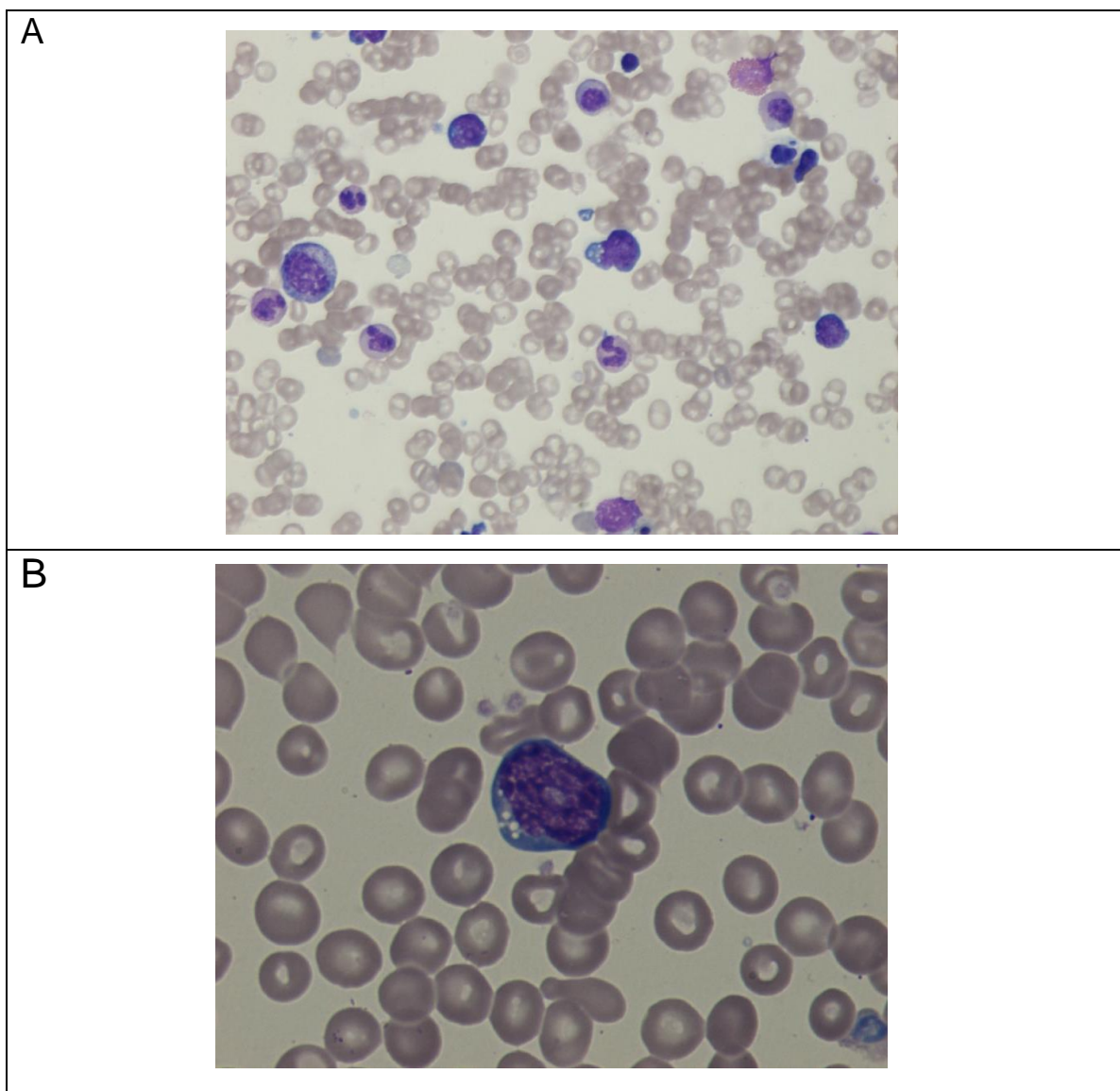


Figura 28 Esfregaço de medula óssea de um doente com linfoma de Burkitt (coloração de Leishman; painel A, 40x; painel B, 100x)

4.1.8.3 CASO 15. LINFOMA DE BURKITT

Informação clínica – Homem, 57 anos. Informação clínica não disponível.

Imunofenotipagem (aspirado medular) – Os linfócitos B representam 81% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+, CD20+ forte, CD5-, CD10+, CD38+, CD34-, TdT-, CD79a+, cadeias leves *lambda*+ e expressão diminuída de bcl2 (figura 29).

Morfologia (esfregaço de medula óssea) – Presença de células de tamanho médio com núcleo com nucléolos e citoplasma basófilo contendo vacúolos lipídicos (figura 30).

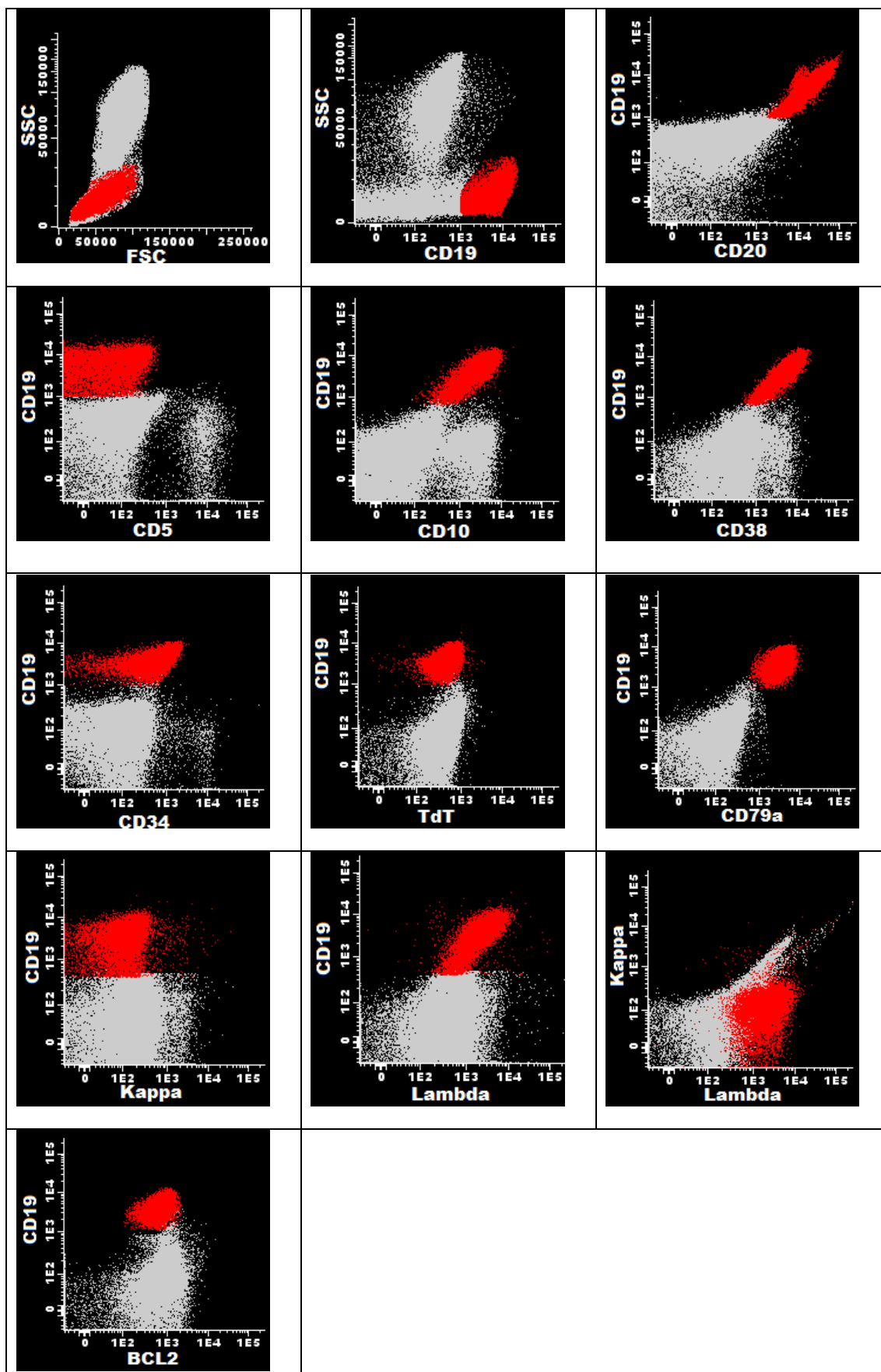


Figura 29 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de medula óssea de um doente com linfoma de Burkitt (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

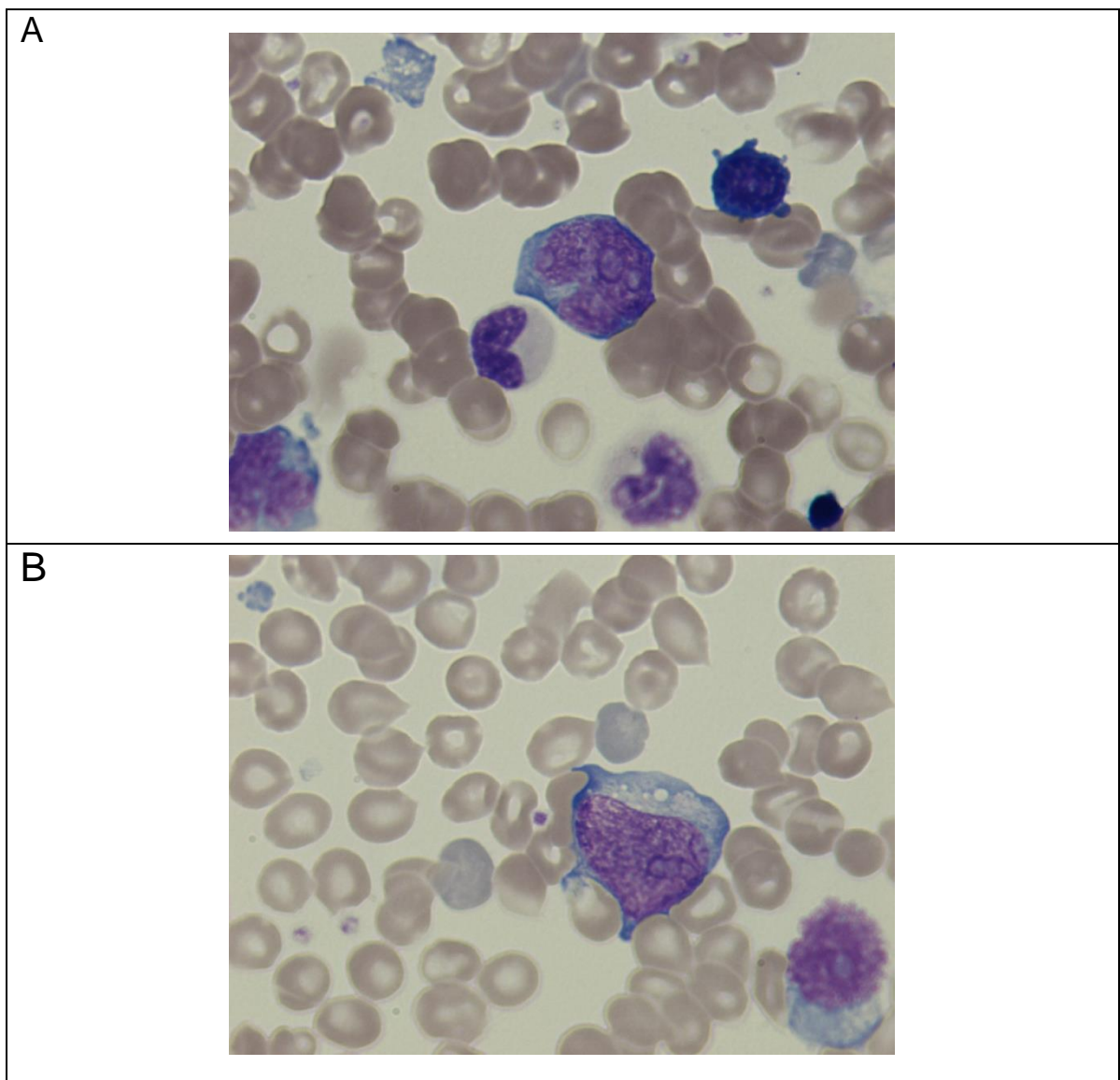


Figura 30 Esfregaço de medula óssea de um doente com linfoma de Burkitt (coloração de Leishman; painel A, 100x; painel B, 100x)

4.1.9 LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES

4.1.9.1 Enquadramento teórico

Clínica: O linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, *diffuse large B cell lymphoma*) e uma neoplasia de linfócitos B comum, representando 25-30% dos linfomas não Hodgkin nos adultos em países ocidentais e em países em desenvolvimento. A apresentação é geralmente ganglionar, mas a doença também pode envolver outros órgãos como o trato gastrointestinal, ossos, testículos, baço, anel de Waldeyer, glândulas salivares, tireóide, fígado, rim e glândulas supra-renais. O envolvimento da medula óssea ocorre em 11-27% dos casos, sendo que 1/3 destes doentes também apresenta envolvimento do sangue periférico. É mais comum em idosos, sendo a idade média de incidência 70 anos. Também pode ocorrer em crianças e jovens adultos, tendo um ligeiro predomínio nos homens. Quando existem sinais e sintomas são muito variáveis dependendo do local de envolvimento. Cerca de 30% dos doentes tem febre, perda de peso e sudorese noturna.

Caraterísticas histopatológicas: Ocorre proliferação difusa de células linfóides grandes nos gânglios linfáticos. O envolvimento ganglionar parcial pode ser interfolicular ou mais raramente sinusoidal.

Caraterísticas morfológicas: São conhecidas 3 variantes morfológicas: a) Centroblástica: é a forma mais comum; a célula predominante é o centroblasto – linfócito grande com núcleo redondo ou oval, cromatina vesiculada, nucléolos periféricos e citoplasma basófilo; b) Imunoblástica: mais de 90% das células são imunoblastos – células com núcleo grande, nucléolo único central e citoplasma basófilo; c) Anaplásica: as células são redondas, ovais ou poligonais e têm núcleo pleomórfico bizarro.

Caraterísticas fenotípicas: As células neoplásicas expressam CD19, CD20, CD22, CD79a e imunoglobulinas de membrana (geralmente IgM). O bcl2 é expresso em 80% dos casos e o bcl6 em 70%. Outros marcadores positivos são o CD10 (30 a 60% dos casos) e o MUM1/IRF4 (35 a 65% dos casos). Na variante anaplásica o CD30 é positivo. O CD5 é geralmente negativo, mas quando é expresso está associado a prognóstico desfavorável.

Caraterísticas genéticas: Foram descritos rearranjos do BCL6 em 30% dos casos; t(14;18) em 20% dos casos; rearranjos do gene MYC em 10% dos casos. Outras alterações são: 14q32, 18q21, 1q21, 3q27, 1q36, 8q24, 3p21, 6q21, 1p22 e 22q11.

4.1.9.2 CASO 16. LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES

Informação clínica – Mulher, 60 anos. Adenopatias

Imunofenotipagem (biópsia ganglionar) – Os linfócitos B representam 61% dos linfócitos com características fenotípicas: CD19+ fraco, CD20+ fraco, CD5-, CD10-, CD38+ fraco, CD23-, HLA-DR+ forte, bcl2+ forte e cadeias leves *lambda*+ forte (figura 31).

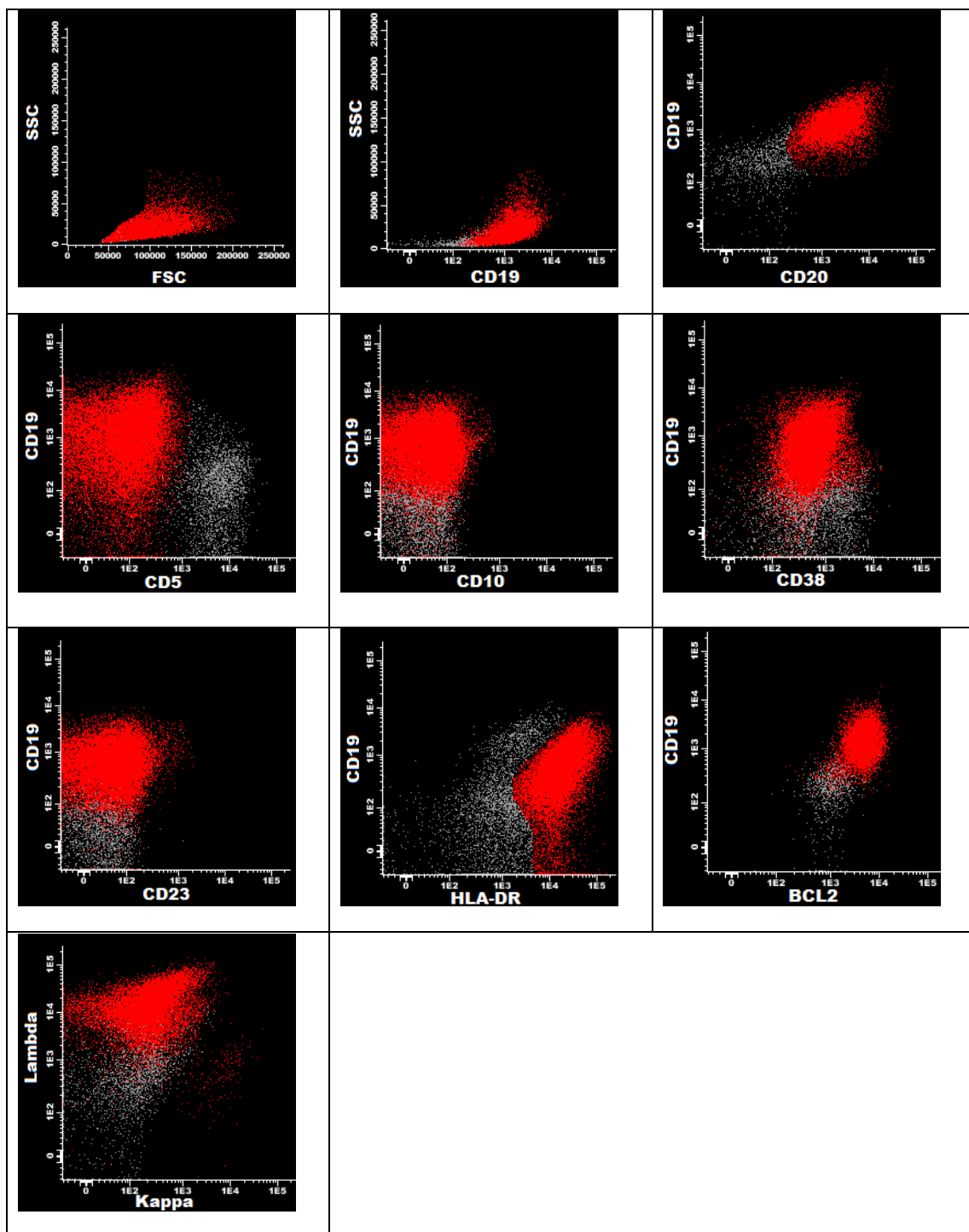


Figura 31 Dotplots representativos da imunofenotipagem das células de um gânglio de um doente com linfoma difuso de células B grandes (■ linfócitos B; ■ restantes leucócitos)

5 CONCLUSÃO

Estes estudos realizados no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar do Porto permitiram aprofundar e adquirir novos conhecimentos, não só em Hematologia Clínica, como também em Citometria de Fluxo.

O estudo de diferentes casos de doenças linfoproliferativas de células B permitiu recolher vários casos típicos que foram selecionados para definir e ilustrar as características clínicas, morfológicas e imunofenotípicas de cada patologia.

Futuramente, estes perfis poderão ser utilizados na construção de um Atlas *online* para identificação e classificação das neoplasias por estudantes e profissionais de saúde. Sendo *online* permitirá uma atualização fácil destas neoplasias, à medida que nova informação se encontrar disponível. O valor destas características reside na sua interpretação como um todo e não de forma isolada.

Por fim, considero que este estudo foi extremamente importante para a minha formação académica e científica, não só pela valiosa experiência laboratorial que me proporcionou, mas também pelos conhecimentos adquiridos e aptidões desenvolvidas no âmbito da área da Hematologia e da Citometria.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mughal TI, Goldman JM, Mughal ST. Understanding Leukemias, Lymphomas and Myelomas. 1st ed. London: Taylor & Francis; 2006.
2. Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, Means Jr. RT. Wintrobe's Clinical Hematology. 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. IARC; 2008.
4. Rodriguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies. Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2007; 18 Suppl 1:i3-i8. Epub 2007/02/22.
5. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood. 2008;111(8):3941-67. Epub 2008/01/17.
6. Panani AD. Is there an association with constitutional structural chromosomal abnormalities and hematologic neoplastic process? A short review. Annals of hematology. 2009;88(4):293-9. Epub 2009/01/09.
7. Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. Williams Hematology. 8ed.Book-Share;2010.
8. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2000;343(26):1910.
9. Wu CJ. CLL clonal heterogeneity: an ecology of competing subpopulations. Blood. 2012 Nov 15; 120(20):4117-8. Epub 2012/11/20
10. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood. 2008;111(12):5446-56. Epub 2008/01/25.
11. Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. J Clin Invest. 2012;122(10):3432-8. Epub 2012/10/02.
12. Herishanu Y1, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2011 Jan 13; 117(2):563-74. Epub 2010 Oct 12.

13. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Geyer SM, LaPlant BR, Call TG, Jelinek DF, et al. Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a universally available prognostic test. *Mayo Clin Proc.* 2007 Apr; 82(4):449-53.
14. Shen PU, Fuller SG, Rezuze WN, Sherburne BJ, DiGiuseppe JA. Laboratory, morphologic, and immunophenotypic correlates of surface immunoglobulin heavy chain isotype expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2001 Dec; 116(6):905-12.
15. Frater JL, McCarron KF, Hammel JP, Shapiro JL, Miller ML, Tubbs RR, et al. Typical and atypical chronic lymphocytic leukemia differ clinically and immunophenotypically. *Am J Clin Pathol.* 2001 Nov; 116(5):655-64.
16. Pallasch CP, Schulz A, Kutsch N, Schwamb J, Hagist S, Kashkar H, et al. Overexpression of TOSO in CLL is triggered by B-cell receptor signaling and associated with progressive disease. *Blood.* 2008 Nov 15;112(10):4213-9
17. Marti GE. The changing definition of CLL. *Blood.* 2009; 113(18):4130-1. Epub 2009/05/02.
18. Ivancević TD, Kurtović NK, Knezević V, Bogdanović A, Mihaljević B, Bozić B, et al. The role of immunophenotyping in differential diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. *Srp Arh Celok Lek.* 2014 Mar-Apr; 142(3-4):197-203.
19. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002; 100(13):4609-14. Epub 2002/10/24.
20. Fournier S, Delespesse G, Rubio M, Biron G, Sarfati M. CD23 antigen regulation and signaling in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest.* 1992 Apr; 89(4):1312-21.
21. Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol.* 2006; 132(6):705-22. Epub 2006/02/21.
22. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2001 Jul 1; 98(1):181-6.
23. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood.* 2003 Jun 15; 101(12):4944-51. Epub 2003 Feb 20.

24. Kujawski L, Ouillet P, Erba H, Saddler C, Jakubowiak A, Kaminski M, et al. Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 112(5):1993-2003. Epub 2008/04/26.
25. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997 Apr 1; 89(7):2516-22.
26. Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood*. 1998 Jun 1; 91(11):4342-9.
27. Olszewski AJ, Castillo JJ. Survival of patients with marginal zone lymphoma: analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*. 2013;119(3):629-38. Epub 2012/08/16.
28. Iannitto E, Ambrosetti A, Ammatuna E, Colosio M, Florena AM, Tripodo C, et al. Splenic marginal zone lymphoma with or without villous lymphocytes. Hematologic findings and outcomes in a series of 57 patients. *Cancer*. 2004;101(9):2050-7. Epub 2004/09/25.
29. Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Rodriguez A, Camacho FI, Algara P, Martinez N, et al. Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood*. 2005;106(5):1831-8. Epub 2005/05/26.
30. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, Bruscaggini A, Rasi S, Spina V, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J. Exp. Med.* 2012;209(9):1537-51. Epub 2012/08/15.
31. Chacón JI, Mollejo M, Muñoz E, Algara P, Mateo M, Lopez L, et al. Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood*. 2002 Sep 1; 100(5):1648-54.
32. Hermine O, Lefrère F, Bronowicki JP, Mariette X, Jondeau K, Eclache-Saudreau V, et al. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002 Jul 11; 347(2):89-94.
33. Matutes E, Oscier D, Montalban C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia*. 2008; 22(3):487-95. Epub 2007/12/21.
34. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance

- to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood*. 1994 Mar 15; 83(6):1558-62.
35. Isaacson PG, Matutes E, Burke M, Catovsky D. The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood*. 1994 Dec 1; 84(11):3828-34.
 36. Franco V, Florena AM, Iannitto E. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood*. 2003; 101(7):2464-72. Epub 2002/11/26.
 37. Montalban C, Abaira V, Arcaini L, Domingo-Domenech E, Guisado-Vasco P, Iannitto E, et al. Risk stratification for Splenic Marginal Zone Lymphoma based on haemoglobin concentration, platelet count, high lactate dehydrogenase level and extrahilar lymphadenopathy: development and validation on 593 cases. *Br J Haematol*. 2012; 159(2):164-71. Epub 2012/08/29.
 38. Salido M, Baro C, Oscier D, Stamatopoulos K, Dierlamm J, Matutes E, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood*. 2010; 116(9):1479-88. Epub 2010/05/19.
 39. Rinaldi A, Mian M, Chigrinova E, Arcaini L, Bhagat G, Novak U, et al. Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype-specific lesions with an impact on the clinical outcome. *Blood*. 2011 Feb 3; 117(5):1595-604. Epub 2010 Nov 29.
 40. Arcaini L, Lazzarino M, Colombo N, Burcheri S, Boveri E, Paulli M, et al. Splenic marginal zone lymphoma: a prognostic model for clinical use. *Blood*. 2006; 107(12):4643-9. Epub 2006/02/24.
 41. Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, Zhao L, Weigelin HG, Chiang MY, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J. Exp. Med*. 2012; 209(9):1553-65. Epub 2012/08/15.
 42. Dungarwalla M, Appiah-Cubi S, Kulkarni S, Saso R, Wotherspoon A, Osuji N, et al. High-grade transformation in splenic marginal zone lymphoma with circulating villous lymphocytes: the site of transformation influences response to therapy and prognosis. *Br J Haematol*. 2008; 143(1):71-4. Epub 2008/08/02.
 43. Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA, Matutes E, Tuset E, Catovsky D. p53 abnormalities in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood*. 2001 Jun 1; 97(11):3552-8.
 44. VanderMolen LA, Urba WJ, Longo DL, Lawrence J, Gralnick H, Steis RG. Diffuse osteosclerosis in hairy cell leukemia. *Blood*. 1989 Nov 1; 74 (6):2066-9.

45. Haglund U, Juliusson G, Stellan B, Gahrton G. Hairy cell leukemia is characterized by clonal chromosome abnormalities clustered to specific regions. *Blood*. 1994 May 1; 83(9):2637-45.
46. Dores GM, Matsuno RK, Weisenburger DD, Rosenberg PS, Anderson WF. Hairy cell leukaemia: a heterogeneous disease? *Br J Haematol*. 2008; 142(1):45-51. Epub 2008/05/15.
47. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011 Jun 16; 364(24):2305-15. Epub 2011 Jun 11.
48. Sharpe RW, Bethel KJ. Hairy cell leukemia: diagnostic pathology. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2006; 20(5):1023-49. Epub 2006/09/23.
49. Wheaton S, Tallman MS, Hakimian D, Peterson L. Minimal residual disease may predict bone marrow relapse in patients with hairy cell leukemia treated with 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood*. 1996 Feb 15; 87(4):1556-60.
50. Grever MR. How I treat hairy cell leukemia. *Blood*. 2010 Jan 7; 115(1):21-8. Epub 2009 Oct 20.
51. Forconi F. Tumor cells of hairy cell leukemia express multiple clonally related immunoglobulin isotypes via RNA splicing. *Blood*. 2001; 98(4):1174-81.
52. Gruber G, Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, Berger R. Basic fibroblast growth factor is expressed by CD19/CD11c-positive cells in hairy cell leukemia. *Blood*. 1999 Aug 1; 94(3):1077-85.
53. Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, Hubmann R, Duechler M, Gisslinger H. TGF- β 1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia. *J Clin Invest*. 2004; 113(5):676-85.
54. Burthem J, Cawley JC. The bone marrow fibrosis of hairy-cell leukemia is caused by the synthesis and assembly of a fibronectin matrix by the hairy cells. *Blood*. 1994 Jan 15; 83(2):497-504.
55. Robbins BA, Ellison DJ, Spinosa JC, Carey CA, Lukes RJ, Poppema S, et al. Diagnostic application of two-color flow cytometry in 161 cases of hairy cell leukemia. *Blood*. 1993 Aug 15; 82(4):1277-87.
56. Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, Riboni R, Rattotti S, Varettoni M, et al. The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Blood*. 2012 Jan 5; 119(1):188-91. Epub 2011 Nov 9.

57. Xi L, Arons E, Navarro W, Calvo KR, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, et al. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation. *Blood*. 2012 Apr 5; 119(14):3330-2. Epub 2011 Dec 30.
58. Sherman MJ, Hanson CA, Hoyer JD. An assessment of the usefulness of immunohistochemical stains in the diagnosis of hairy cell leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2011; 136(3):390-9. Epub 2011/08/19.
59. Falini B, Tiacci E, Liso A, Basso K, Sabattini E, Pacini R, et al. Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *Lancet*. 2004; 363(9424):1869-71.
60. Sainati L, Matutes E, Mulligan S, de Oliveira MP, Rani S, Lampert IA, et al. A variant form of hairy cell leukemia resistant to alpha-interferon: clinical and phenotypic characteristics of 17 patients. *Blood*. 1990 Jul 1; 76(1):157-62.
61. Arons E, Suntum T, Stetler-Stevenson M, Kreitman RJ. VH4-34+ hairy cell leukemia, a new variant with poor prognosis despite standard therapy. *Blood*. 2009 Nov 19; 114(21):4687-95. Epub 2009 Sep 10.
62. Shao H, Calvo KR, Gronborg M, Tembhare PR, Kreitman RJ, Stetler-Stevenson M, et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. *Leukemia Res*. 2013; 37(4):401-9. Epub 2013/01/26.
63. Lin P, Molina TJ, Cook JR, Swerdlow SH. Lymphoplasmacytic lymphoma and other non-marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation. *American journal of clinical pathology*. 2011; 136(2):195-210. Epub 2011/07/16.
64. Kristinsson SY, Koshiol J, Goldin LR, Bjorkholm M, Turesson I, Gridley G, et al. Genetics- and immune-related factors in the pathogenesis of lymphoplasmacytic lymphoma/ Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clinical lymphoma & myeloma*. 2009; 9(1):23-6. Epub 2009/04/14.
65. Braggio E, Dogan A, Keats JJ, Chng WJ, Huang G, Matthews JM, et al. Genomic analysis of marginal zone and lymphoplasmacytic lymphomas identified common and disease-specific abnormalities. *Modern Pathol*. 2012;25(5):651-60. Epub 2012/02/04.
66. Iwanaga M, Chiang CJ, Soda M, Lai MS, Yang YW, Miyazaki Y, et al. Incidence of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom's macroglobulinaemia in Japan and Taiwan population-based cancer registries, 1996-2003. *Int J Cancer*. 2014; 134(1):174-80. Epub 2013/06/21.
67. Naderi N, Yang DT. Lymphoplasmacytic lymphoma and Waldenström macroglobulinemia. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Apr; 137(4):580-5.

68. Ikeda J, Morii E, Yamauchi A, Kohara M, Hashimoto N, Yoshikawa H, et al. Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type developing in gonarthrosis deformans. *J Clin Oncol*. 2007; 25(27):4310-2. Epub 2007/09/20.
69. Naresh KN, Trivedi P, Luqmani A, Rahemtulla A. Bone marrow aspirate and trephine biopsy findings in lymphoplasmacytic lymphoma. *Am J Hematol*. 2011; 86(3):311-2. Epub 2011/02/18.
70. Morice WG, Chen D, Kurtin PJ, Hanson CA, McPhail ED. Novel immunophenotypic features of marrow lymphoplasmacytic lymphoma and correlation with Waldenström's macroglobulinemia. *Modern Pathol*. 2009; 22(6):807-16. Epub 2009/03/17.
71. Nakao M, Oguri T, Miyazaki M, Hijikata H, Yokoyama M, Kunii E, et al. Transformed lymphoplasmacytic lymphoma involving the main carina: A case report. *Oncology letters*. 2013; 6(2):542-4. Epub 2013/10/19.
72. Lin P, Jorgensen JL, Bueso-Ramos CE, Medeiros LJ, Konoplev S. Immunophenotypic Profile of Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström Macroglobulinemia. *American journal of clinical pathology*. 2005; 124(3):414-20.
73. Roberts MJ, Chadburn A, Ma S, Hyjek E, Peterson LC. Nuclear protein dysregulation in lymphoplasmacytic lymphoma/waldenström macroglobulinemia. *Am J Hematol*. 2013; 139(2):210-9. Epub 2013/01/29.
74. Kraus MD. Lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia: one disease or three? *Am J Clin Pathol*. 2001 Dec;116(6):799-801
75. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Invest*. 2012; 122(10):3424-31. Epub 2012/10/02.
76. Martin AR, Weisenburger DD, Chan WC, Ruby EI, Anderson JR, Vose JM, et al. Prognostic value of cellular proliferation and histologic grade in follicular lymphoma. *Blood*. 1995 Jun 15; 85(12):3671-8.
77. Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, Moreno V, et al. Follicular lymphomas with and without translocation t (14; 18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood*. 2009; 114(4):826-34. Epub 2009/05/28.
78. Biagi JJ, Seymour JF. Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. *Blood*. 2002 Jun 15; 99(12):4265-75.
79. Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, Holte H, Delabie J, Smeland EB, et al. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based

- cohort of 505 patients with long follow-up times. *Br J Haematol*. 2012; 156(2):225-33. Epub 2011/12/01.
80. Canioni D, Brice P, Lepage E, Chababi M, Meignin V, Salles B, et al. Bone marrow histological patterns can predict survival of patients with grade 1 or 2 follicular lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. *Br J Haematol*. 2004; 126(3):364-71. Epub 2004/07/20.
 81. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rüdiger T, Wilhelm M, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood*. 2002 May 15; 99(10):3806-12.
 82. Lersbach RB1, Shay-Seymore D, Moore J, Banks PM, Hasserjian RP, Sandlund JT, et al. Clinicopathologic analysis of follicular lymphoma occurring in children. *Blood*. 2002 Mar 15; 99(6):1959-64.
 83. Ghia P, Boussiotis VA, Schultze JL, Cardoso AA, Dorfman DM, Gribben JG, et al. Unbalanced expression of bcl-2 family proteins in follicular lymphoma: contribution of CD40 signaling in promoting survival. *Blood*. 1998 Jan 1; 91(1):244-51.
 84. Karube K, Guo Y, Suzumiya J, Sugita Y, Nomura Y, Yamamoto K, et al. CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features. *Blood*. 2007 Apr 1; 109(7):3076-9.
 85. Freedman A. Follicular lymphoma: 2012 update on diagnosis and management. *Am J Hematol*. 2012; 87(10):988-95. Epub 2012/09/25.
 86. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007; 21(1):18-29. Epub 2006/10/14.
 87. Bosga-Bouwer AG, van Imhoff GW, Boonstra R, van der Veen A, Haralambieva E, van den Berg A, et al. Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. *Blood*. 2003 Feb 1; 101(3):1149-54.
 88. Smith SM. Dissecting follicular lymphoma: high versus low risk. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013; 2013:561-7.
 89. Ferrer A, Salaverria I, Bosch F, Villamor N, Rozman M, Bea S, et al. Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer*. 2007; 109(12):2473-80. Epub 2007/05/05.
 90. Hitz F, Bargetzi M, Cogliatti S, Lohri A, Taverna C, Renner C, et al. Diagnosis and treatment of mantle cell lymphoma. *Swiss medical weekly*. 2013; 143:w13868. Epub 2013/11/15.

91. Liu Z, Dong HY, Gorczyca W, Tsang P, Cohen P, Stephenson CF, et al. CD5-mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2002 Aug; 118(2):216-24.
92. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 1997 Mar 15; 89(6):2067-78.
93. Pileri SA, Falini B. Mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2009; 94(11):1488-92. Epub 2009/11/03.
94. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol*. 2005; 131(1):29-38. Epub 2005/09/22.
95. Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, Matsuno Y, Ichinohasama R, Okamoto M, et al. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*. 2000 Apr 1; 95(7):2253-61.
96. Hsu P, Yang T, Sheikh-Fayyaz S, Brody J, Bandovic J, Roy S, et al. Mantle cell lymphoma with in situ or mantle zone growth pattern: a study of five cases and review of literature. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Feb 15; 7(3):1042-50.
97. Gao J, Peterson L, Nelson B, Goolsby C, Chen YH. Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2009; 132(5):699-706. Epub 2009/10/23.
98. Kraus TS, Sillings CN, Saxe DF, Li S, Jaye DL. The role of CD11c expression in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134(2):271-7. Epub 2010/07/28.
99. Sun T, Nordberg ML, Cotelingam JD, Veillon DM, Ryder J. Fluorescence in situ hybridization: method of choice for a definitive diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2003; 74(1):78-84. Epub 2003/09/02.
100. Gualco G, Weiss LM, Harrington WJ, Jr., Bacchi CE. BCL6, MUM1, and CD10 expression in mantle cell lymphoma. *Appl Immunohisto M M*. 2010; 18(2):103-8. Epub 2009/10/15.
101. Mozos A, Royo C, Hartmann E, De Jong D, Baro C, Valera A, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*. 2009; 94(11):1555-62. Epub 2009/11/03.
102. Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, Pittaluga S, Royo C, Song JY, et al. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica*. 2012; 97(2):270-8. Epub 2011/11/08.

103. Wlodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V, Van Roosbroeck K, Pospisilova H, Minnei F, et al. Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood*. 2008; 111(12):5683-90. Epub 2008/04/09.
104. Cornet E, Lesesve JF, Mossafa H, Sebahoun G, Levy V, Davi F, et al. Long-term follow-up of 111 patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes. *Leukemia*. 2009; 23(2):419-22. Epub 2008/08/01.
105. Loembé MM, Lamoureux J, Deslauriers N, Darveau A, Delage R. Lack of CD40-dependent B-cell proliferation in B lymphocytes isolated from patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2001 Jun; 113(3):699-705.
106. Troussard X, Cornet E, Lesesve JF, Kourel C, Mossafa H. Polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes (PPBL). *Onco Targets Ther*. 2008 Oct 1; 1:59-66.
107. Delage R, Jacques L, Massinga-Loembe M, Poulin J, Bilodeau D, Mignault C, et al. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: further evidence for a genetic disorder associated with B-cell abnormalities. *Br J Haematol*. 2001 Sep; 114(3):666-70.
108. Sun P, Juskevicius R. Histological and immunohistochemical features of the spleen in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis closely mimic splenic B-cell lymphoma. *Diagn Pathol*. 2012 Aug 19; 7:107.
109. Del Giudice I, Pileri SA, Rossi M, Sabattini E, Campidelli C, Starza ID, et al. Histopathological and molecular features of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL) with progressive splenomegaly. *Br J Haematol*. 2009; 144(5):726-31. Epub 2009/01/13.
110. Granados E, Llamas P, Pinilla I, Tomás JF, Font P, Cámara R, et al. Persistent polyclonal B lymphocytosis with multiple bcl-2/IgH rearrangements: a benign disorder. *Haematologica*. 1998 Apr; 83(4):369-75.
111. Schmidt-Hieber M, Burmeister T, Weimann A, Nagorsen D, Hofmann WK, Thiel E, et al. Combined automated cell and flow cytometric analysis enables recognition of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL), a study of 25 patients. *Ann Hematol*. 2008; 87(10):829-36. Epub 2008/07/01.
112. Himmelmann A, Gautschi O, Nawrath M, Bolliger U, Fehr J, Stahel RA. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis is an expansion of functional IgD(+)CD27(+) memory B cells. *Br J Haematol*. 2001 Aug; 114(2):400-5.

113. Kelemen K, Braziel RM, Gatter K, Bakke TC, Olson S, Fan G. Immunophenotypic variations of Burkitt lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134(1):127-38. Epub 2010/06/17.
114. Bellan C, Lazzi S, Hummel M, Palumbo N, de Santi M, Amato T, et al. Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas. *Blood*. 2005; 106(3):1031-6. Epub 2005/04/21.
115. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. 2004; 104(10):3009-20. Epub 2004/07/22.
116. Linch DC. Burkitt lymphoma in adults. *Br J Haematol*. 2012; 156(6):693-703. Epub 2011/09/20.
117. Hecht JL, Aster JC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2000 Nov 1; 18(21):3707-21.
118. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006 Jun 8; 354(23):2419-30.
119. Piccaluga PP, De Falco G, Kustagi M, Gazzola A, Agostinelli C, Tripodo C, et al. Gene expression analysis uncovers similarity and differences among Burkitt lymphoma subtypes. *Blood*. 2011 Mar 31; 117(13):3596-608. Epub 2011 Jan 18.
120. Schniederjan SD, Li S, Saxe DF, Lechowicz MJ, Lee KL, Terry PD, et al. A novel flow cytometric antibody panel for distinguishing Burkitt lymphoma from CD10+ diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2010; 133(5):718-26. Epub 2010/04/17.
121. Haralambieva E, Schuurin E, Rosati S, van Noesel C, Jansen P, Appel I, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization for detection of 8q24/MYC breakpoints on routine histologic sections: validation in Burkitt lymphomas from three geographic regions. *Genes Chromosome Canc*. 2004; 40(1):10-8. Epub 2004/03/23.
122. Onciu M, Schlette E, Zhou Y, Raimondi SC, Giles FJ, Kantarjian HM, et al. Secondary chromosomal abnormalities predict outcome in pediatric and adult high-stage Burkitt lymphoma. *Cancer*. 2006; 107(5):1084-92. Epub 2006/07/25.
123. Toujani S, Dessen P, Ithzar N, Danglot G, Richon C, Vassetzky Y, et al. High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma. *PLoS one*. 2009; 4(9):e7089. Epub 2009/09/18.

124. Shenoy PJ, Malik N, Nooka A, Sinha R, Ward KC, Brawley OW, et al. Racial differences in the presentation and outcomes of diffuse large B-cell lymphoma in the United States. *Cancer*. 2011; 117(11):2530-40. Epub 2011/06/01.
125. Troppan K, Wenzl K, Deutsch A, Ling H, Neumeister P, Pichler M. MicroRNAs in diffuse large B-cell lymphoma: implications for pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapy. *Anticancer Res*. 2014 Feb; 34(2):557-64.
126. Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, Berry B, Ruskova A, Berkahn L, et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2011; 29(11):1452-7. Epub 2011/03/09.
127. De Paepe P, Achten R, Verhoef G, Wlodarska I, Stul M, Vanhentenrijk V, et al. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol*. 2005; 23(28):7060-8. Epub 2005/09/01.
128. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003; 101(1):78-84. Epub 2002/10/24.
129. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Karnan S, Ohshima K, et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2005; 106(5):1770-7. Epub 2005/05/12.
130. Ottensmeier CH, Stevenson FK. Isotype switch variants reveal clonally related subpopulations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2000 Oct 1; 96(7):2550-6.
131. Zinzani PL, Broccoli A, Stefoni V, Musuraca G, Abruzzese E, De Renzo A, et al. Immunophenotype and intermediate-high international prognostic index score are prognostic factors for therapy in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Cancer*. 2010; 116(24):5667-75. Epub 2010/08/26.
132. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, Manyam GC, Visco C, Tzankov A, et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013 Apr 4; 121(14):2715-24. Epub 2013 Jan 23.
133. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, Ichinohasama R, Nakamura N, Yoshino T, et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood*. 2002 Feb 1; 99(3):815-21.

134. Gu MJ, Ha JO. CD56 positive diffuse large B-cell lymphoma: a case report and literature review. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013 Nov 15; 6(12):3023-5.
135. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippon K, Geelen E, van Krieken JH, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1998 Nov 1; 92(9):3152-62.
136. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013 Mar 21; 121(12):2253-63. Epub 2013 Jan 18.
137. Anderson. Immunophenotyping of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) defines multiple sub-groups of germinal centre-like tumours displaying different survival characteristics. *Int J Oncol*. 2009; 35(05).
138. Davidson B, Dong HP, Berner A, Risberg B. The diagnostic and research applications of flow cytometry in cytopathology. *Diagn Cytopathol*. 2012; 40(6):525-35. Epub 2012/05/24.